

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE LETALITÄT DER
INTER SE-KREUZUNG VON RANA ESCULENTA

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE

VORGELEGT DER

PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II

DER

UNIVERSITÄT ZÜRICH

VON

JÜRG ALEXANDER BINKERT

AUS LEIBSTADT AG

BEGUTACHTET VON

HERRN PROF. DR. P. S. CHEN

ZÜRICH

1981

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE LETALITÄT DER
INTER SE-KREUZUNG VON RANA ESCULENTA

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE

VORGELEGT DER

PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II

DER

UNIVERSITÄT ZÜRICH

VON

JÜRG ALEXANDER BINKERT

AUS LEIBSTADT AG

BEGUTACHTET VON

HERRN PROF. DR. P. S. CHEN

ZÜRICH

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026



INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	3
1. Zuchtmethoden und Fangorte der Elterntiere	3
a) Allgemeine Zuchtbedingungen	3
b) Künstliche Befruchtung	4
c) Biotope, aus denen adulte Elterntiere gesammelt wurden	5
2. Parabiose	7
3. Auftrennung der Isozyme der Lactatdehydrogenase (LDH)	9
3.1. PAGE nach Davis	9
3.2. Isoelektrische Fokussierung	9
4. Aminosäureanalyse	10
5. Immunologische Untersuchungen	10
5.1. Gewinnung der Antiseren	10
5.2. Ouchterlony- Test	11
5.3. Zweidimensionale Immunelektrophorese	12
6. Erythrozyten	14
7. Gewichtszunahme und Entwicklungsgeschwindigkeit	14
8. Thyroxinversuch	14
9. Histologische Präparation	15
III. RESULTATE	16
1. Parabiose	16
1.1. Uebersicht über das Gesamtexperiment	16
1.2. Entwicklung der einzelnen Parabiose-serien	16
1.3. Vergleich der Lebensdauer von Kontroll-tieren zu Parabiosen	22
1.4. Betrachtung der einzelnen Parabiose-klassen	23
1.5. Illustrationen zum Parabioseversuch	30
1.6. Statistischer Anhang zum Parabioseversuch	35

2. Polymorphismus der Isozyme der Lactatdehydrogenase	37
3. Untersuchung der freien Aminosäuren	47
4. Immunologie	51
4.1. Immunologische Unterschiede in Totalhomogenaten	53
4.2. Immunologische Unterschiede im Serum von Kaulquappen	53
5. Ermittlung des Ploidiegrades durch Erythrozytenmessung	59
6. Gewichtszunahme und Entwicklungsgeschwindigkeit	62
7. Thyroxinversuch	62
8. Histologie	67
IV. DISKUSSION	71
1. Vergleich der Froschpopulationen verschiedenartiger Biotope	71
2. Die Entwicklung des letalen Partners in Parabiose	73
3. Die B- Untereinheiten der LDH-Isozyme in der F ₁ -Generation	77
4. Die freien Aminosäuren in vitalen und letalen Kaulquappen	80
5. Immunologische Hinweise auf die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen <u>Rana esculenta</u> und <u>Rana ridibunda</u>	81
6. Zum Problem der Triploidie im <u>Rana esculenta</u> -Komplex	82
7. Exogene Beeinflussung der Kaulquappen durch Thyroxin	84
V. ZUSAMMENFASSUNG	85
VI. LITERATURVERZEICHNIS	87
VII. ABKÜRZUNGEN	92

I. EINLEITUNG

Bei der Untersuchung der taxonomischen Stellung von Rana esculenta traten im Verlaufe der vergangenen Jahrzehnte bei allen Forschern unterschiedliche Ansichten auf. Die Beschreibungen der Arten Rana esculenta L. und Rana ridibunda PALLAS stammen aus dem 18. Jahrhundert, während Rana lessonae CAMERANO in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts entdeckt wurde (siehe Engelmann 1973). Noch Karaman (1948) betrachtete diese drei Phänotypen als selbständige Arten, während Kauri (1959) den Artcharakter von Rana esculenta nicht bezweifelte, jedoch die Phänotypen Rana ridibunda und Rana lessonae als Subspezies betrachtete, welche durch klimatische oder ökologische Bedingungen zustandekommen. Eine nochmals andere Ansicht vertraten Mertens und Wermuth (1960), welche Rana ridibunda und Rana esculenta als Arten anerkennen, jedoch Rana lessonae als Synonym von Rana esculenta behandeln. Die Ansicht Karamans (1948) wurde durch Berger (1964) unterstützt, während Günther (1968) Rana ridibunda und Rana esculenta als Arten, Rana lessonae jedoch als einen Oekotyp von Rana esculenta betrachtete.

Aufgrund seiner biometrischen Befunde berichtete Berger (1968) erstmals über den Hybridcharakter von Rana esculenta. Biochemische Untersuchungen über die Serumproteine der verschiedenen Grünfroschtypen bestätigten den Hybridcharakter von Rana esculenta (Engelmann 1972, Tunner 1970, 1972, 1973, Vogel 1973). Das gleiche Ergebnis brachte die umfassende Analyse des Rana esculenta - Komplexes in Bezug auf die Vererbung der Lactatdehydrogenase - Isozyme (Vogel 1977, Vogel und Chen 1976, 1977).

Obwohl heute nicht mehr am Hybridcharakter von Rana esculenta gezweifelt werden kann, stellen sich doch noch erhebliche Probleme: Verschiedene Autoren (Berger 1979, Günther 1975) stellten fest, dass die Meiose bei Rana esculenta gestört ist. Dies kann wiederum verschiedene Fol-

gen nach sich ziehen: So wurde von teilweise inaktiven Spermien berichtet (Günther 1975), sowie von triploiden Individuen des Phänotyps Rana esculenta (Uzzell et al. 1975). In neueren Arbeiten wird darauf hingewiesen, dass die Angehörigen des Phänotyps Rana esculenta eine reduzierte Fertilität aufweisen. (Berger 1979) Besonders auffallend ist die hohe Letalität der Nachkommen bei der inter-se Kreuzung (siehe Berger 1970, Vogel und Chen 1976, Vogel 1977)

Die Variabilität in Bezug auf die Populationsstruktur und damit auch in Bezug auf die populationsgenetischen Verhältnisse der Grünfrösche ist innerhalb des europäischen Verbreitungsgebietes sehr gross. In der vorliegenden Arbeit versuchten wir, den Erbgang innerhalb des Rana esculenta - Komplexes mittels entwicklungsphysiologischer, biochemischer und immunologischer Methoden abzuklären.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. P. S. Chen, danke ich herzlich für die Leitung und Förderung dieser Arbeit. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. P. Borner für die grosse Hilfsbereitschaft und sein reges Interesse an der Lösung zahlreicher Teilprobleme. Für die wertvollen Anregungen und Kritiken und die kameradschaftliche Hilfe beim Sammeln der Frösche danke ich Herrn H.-R. Federer herzlich. In meinen Dank einschliessen möchte ich auch Herrn Sulzer für die Anfertigung von wertvollen Laborhilfsmitteln und Herrn Dr. J.C. Perriard und Herrn Bächtold für die Mithilfe bei der Immunisierung. Auch meiner Frau sei an dieser Stelle herzlichst gedankt für die Geduld, die sie aufbrachte, sowie für die vielfältige Hilfe.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Zuchtmethoden und Fangorte der Elterntiere

a.) Allgemeine Zuchtbedingungen

Adulte Frösche der Phänotypen Rana lessonae und Rana esculenta wurden jeweils im Mai gefangen. Dabei wurden drei Weiher im Kanton Zürich und ein Weiher im Kanton Thurgau berücksichtigt. Bei der Auswahl dieser Biotope spielte folgender Faktor eine Rolle: Die Fundorte sollten sich möglichst in Bezug auf ihre Entstehungsgeschichte unterscheiden, weil dadurch die Möglichkeit gegeben ist, eventuelle phylogenetische Entwicklungen zu verfolgen. Daran ist die Hypothese gebunden, dass Populationen in postglazial entstandenen Weihern älter sind als solche aus jungen Baggerseen. Hinweise, dass diese Hypothese richtig ist, ergeben sich einerseits aus früheren Arbeiten (Blankenhorn 1973) und andererseits aus unseren eigenen Fangstatistiken.

Die Tiere aus den einzelnen Biotopen wurden auch in Gefangenschaft getrennt gehalten. In grossen Trögen konnten sich die Frösche paaren. Paare wurden isoliert in 10 l-Aquarien gesetzt, bis die Weibchen fertig gelaicht hatten. Der Laich wurde in Plasticbecken von 5 l Inhalt bei Zimmertemperatur aufgezogen und ab Stadium 25 (Shumway 1940) mit Brennesselpulver und Luzernemehl (1 : 1) gefüttert. Das Wasser wurde zwei Mal wöchentlich erneuert.

Um Irrtümer in der Bestimmung des Phänotyps der Elterntiere auszuschliessen, wurde das Albuminmuster mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt. Das Serumalbumin bei Rana esculenta erscheint als eine Doppelbande, während die anderen zwei Phänotypen je eine einfache Albuminbande mit unterschiedlicher Mobilität aufweisen (Vogel 1973).

Die Embryonen, welche für die Parabiose- und Thyroxinversuche Verwendung fanden, wurden bei 18° C gehalten, um eine synchrone Entwicklung zu gewährleisten. Insbesondere der Laich für die Parabioseversuche wurde zum Teil während

maximal zwei Tagen bei 4° C gehalten, um die Entwicklung zu verzögern. Auf diese Art konnten Laiche verschiedenen Datums trotzdem miteinander verarbeitet werden. Kontrollen zeigten, dass Kaulquappen, welche während 3 Tagen 4° C ausgesetzt waren, keinen Schaden nahmen und sich anschliessend bei Zimmertemperatur normal weiterentwickelten.

b.) Künstliche Befruchtung

Neben natürlicher Paarung wurden künstliche Besamungen durchgeführt. Frisch gefangenen Weibchen wurden zwei Hypophysen von Weibchen intraperitoneal gespritzt. Die Hypophysen wurden in 0,75 ml Holtfreterlösung durch Ultraschall homogenisiert. Bereits am folgenden Tag konnten aus so behandelten Weibchen durch leichtes Pressen Eier gewonnen werden. Als erfolgreichstes Zuchtmedium für künstliche Befruchtungen erwies sich eine Mischung von Holtfreterlösung, destilliertem Wasser und Hahnenwasser im Verhältnis 1 : 2 : 7. Da ab 1979 kein Quellwasser mehr zur Verfügung stand, wurde das Stadtwasser jeweils während mindestens 48 Stunden stehen gelassen.

Die laichbereiten Weibchen wurden in Eiswasser gelegt, um die Muskulatur zu lockern. Die Eier lassen sich so leichter aus dem Eileiter pressen.

Die Männchen wurden ebenfalls in Eiswasser immobilisiert und anschliessend dekapitiert. Die heraussezierten Hoden wurden in kleine Halbrundschalen gegeben und in ca. 5 ml Zuchtwasser zerzupft. Die mikroskopische Kontrolle solcher Spermasuspensionen war immer positiv, das heisst, es konnte eine aktive Bewegung der Spermien festgestellt werden.

Die Eier wurden jetzt in Petrischalen, welche bereits Zuchtwasser und ca. 1 ml Spermasuspension enthielten, abgestreift. Nach 20 min wurde das Zuchtwasser erneuert. Alle Eier, welche sich nach einer Stunde drehten, so dass der animale Pol sich nach oben richtet, waren befruchtet und hatten die erste Furchung bereits eingeleitet. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Laich in 5 l -Zuchtbecken gegeben.

Es soll an dieser Stelle auch von Schwierigkeiten berichtet werden, welche im Zusammenhang mit künstlichen Befruchtungen auftauchen können: Die Befruchtungsraten lagen teilweise unter 10 %. Solche Laiche können für Serienuntersuchungen nicht verwendet werden, da die Anzahl an guten Eiern viel zu klein ist. Wir versuchten, einige Parameter, welche für die erfolgreiche künstliche Befruchtung verantwortlich sein könnten, zu erfassen. Wesentliche Rollen spielen dabei:

- Der Reifegrad der Eier
- Die mechanische Verletzungsgefahr beim Auspressen der Eier
- Die Temperatur des Zuchtwassers
- Die Dichte der Spermasuspension.

Wir beobachteten oft Eier, welche direkt nach dem Abstreifen sehr gut aussahen, jedoch schon nach wenigen Minuten am Animalpol gewisse Deformationen aufwiesen. Häufig fürchten sich solche Eier trotzdem, aber immer sehr unregelmässig, was zu einem Entwicklungsstillstand schon vor dem Blastulastadium führte. Dieses Phänomen ist auf eine unphysiologische Zusammensetzung des Zuchtwassers zurückzuführen. Mit der erwähnten Zuchtwassermischung konnten Befruchtungsraten von über 90 % erreicht werden.

Eier, welche zu konzentrierten Spermasuspensionen ausgesetzt werden, beginnen sich ebenfalls zu furchen, aber an ihrer Oberfläche lassen sich dutzende von Spermaeinschlägen feststellen.

c.) Biotope, aus denen adulte Elterntiere gesammelt wurden

B i o t o p A : Alte, nicht mehr genutzte Kiesgrube mit üppigem Pflanzenbewuchs. Die Umgebung besteht aus Wiesland, Wald und Obstgärten. Extrem steil abfallende Ufer wechseln ab mit eher seichten Ufern. Der Weiher ist in diesem Jahrhundert entstanden und die Besiedelung durch Amphibien fällt demnach auch in die jüngste Zeit. Auffallend

ist hier die Artenarmut an Amphibien. Ausser Rana esculenta und Rana lessonae findet man hier nur Alytes obstetricans, nicht aber Triturus oder Bombina. Auch Hyla arborea oder Bufo fehlen.

B i o t o p B : Im Gegensatz zu Fundort A gibt es hier alle erwähnten Amphibienarten. Dieser Teich ist allerdings unter Naturschutz. Das biologische Gleichgewicht wird gestört durch Einsatz und Entnahme verschiedener Amphibienarten zu Schulzwecken. Unter diesem Gesichtspunkt sind die ohnehin eher kleinen Fangzahlen irrelevant für eine populationsgenetische Diskussion. Der Weiher ist ebenfalls geologisch jüngeren Datums.

B i o t o p C : Dieser Weiher ist ebenfalls eine ehemalige Kiesgrube und Schuttablagerungsplatz. An den flachen Ufern findet man starken Schilfbewuchs (Phragmites communis Trin.), an den steilen Weiden (Salix alba). Der ganze Teich ist von Weidland umgeben. Da in der engeren Umgebung noch viele kleine Feuchtstandorte sind, stösst man auf einen grossen Artenreichtum. Im Bezug auf das Entstehungsalter und die Besiedelung durch Amphibien liegen dieselben Verhältnisse vor wie bei Biotop A.

B i o t o p D : Dieser Waldweiher ist ein eiszeitliches Relikt, da er im Bereich der Moränen des zürcherischen Unterlandes liegt (siehe Hantke 1967). Nach einer geologischen Betrachtung von Stäubli (mündliche Mitteilung), liegt der Weiher in einem durch Wallmoränen gebildeten Dreieck. Die Moränen stammen aus der Würmeiszeit und umrahmen eine Geländekammer, in welcher der heutige Teich liegt. Mit grosser Wahrscheinlichkeit dürfte dieser Weiher früher durch Frösche besiedelt worden sein als die Biotope A und C. Obwohl dieser Waldweiher schon recht alt ist, findet man hier ausser vereinzelt Unken (Bombina variegata) nur die beiden Wasserfroschphänotypen Rana esculenta und Rana lessonae.

Die Zahlen einer Fangstatistik über drei Jahre zeigen eindeutige Unterschiede sowohl in Bezug auf die Verteilung

der Phänotypen Rana esculenta und Rana lessonae, als auch auf die Geschlechtsverteilung innerhalb dieser Phänotypen. (siehe Tab. 1)

Tab. 1: Fangstatistik der Jahre 1978, 1979 und 1980

Biotop	A		B		C		D		Phänotyp
Jahr	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	
1978	-	-	-	-	33	4	6	4	<u>R.esculenta</u>
1979	18	17	4	4	27	5	8	7	
1980	5	5	1	5	12	17	16	6	
Total	23	22	5	8	72	26	30	17	
1978	-	-	-	-	6	6	9	10	<u>R.lessonae</u>
1979	2	1	6	3	3	3	18	25	
1980	-	-	-	4	-	3	11	18	
Total	2	1	6	7	9	12	38	53	

2. Parabiose

Die Technik der Parabiose ist eine klassische Methode in der Entwicklungsbiologie. Mit Hilfe dieser Technik kann man feststellen, ob die Bildung eines Organsystems in einem Amphibienembryo autonom verläuft oder durch exogene Faktoren modifiziert werden kann (siehe Hamburger 1942, Volpe 1980) In der vorliegenden Arbeit interessierten wir uns, ob Unterschiede in der Entwicklung und Lebensdauer von Kaulquappen verschiedener Letalkreuzungen in Parabiose mit vitalen Kontrollen oder mit anderen letalen Individuen

feststellbar sind.

Zwei Kaulquappen gleichen physiologischen Alters (Stad. 15 - 17 nach Shumway) wurde im künftigen Rumpfbereich lateral mit Platin-Nadel und -Schlinge ein Stück Ektoderm herausgeschnitten. Diese Operation erfolgte in Halbrundschalen mit einem Agarboden in Holtfreterlösung bei möglichst niedriger Temperatur (5° - 10° C). Beide Partner wurden über Nacht bei 18° C in einer Grube im Agarboden belassen, so dass sie miteinander verwachsen konnten. (Abb. 1) Am folgenden Tag wurden die Parabiosen in neue Halbrundschalen umgesetzt. Zuchtmedium war hier ausschliesslich Holtfreterlösung. Alle Parabiosen wurden bei 18° C gehalten und sobald sie das Stadium 25 erreicht hatten, mit der Fütterung begonnen. In diesem Zeitpunkt wurde auch der Agarboden weggelassen.

Die Parabiosen wurden bis zu ihrem Tode beobachtet und ihre Entwicklung photographisch festgehalten.

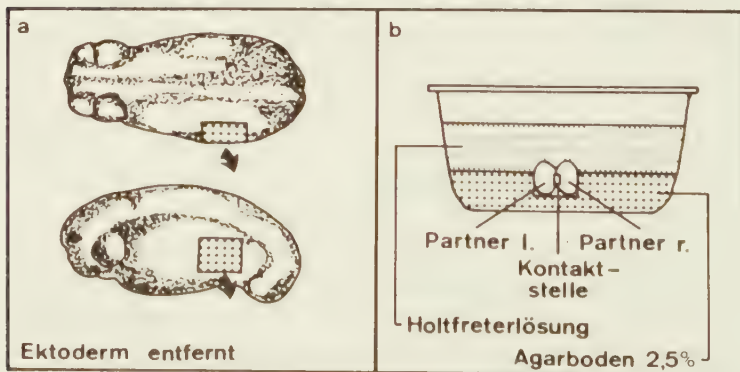


Abbildung 1: Versuchsanordnung im Parabioseexperiment

3. Auftrennung der Isozyme der Lactatdehydrogenase (LDH)

Die Isozyme der Lactatdehydrogenase wurden einerseits mittels Polyacrylamid- Gelelektrophorese (PAGE) und andererseits durch isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt.

3.1. PAGE nach Davis

Die Polyacrylamidgele wurden nach dem System von Davis und Ornstein hergestellt (Davis 1964). Das Trenngel wies dabei eine Acrylamidkonzentration von 5,5 % und eine Länge von 9,5 cm auf. Die Länge des Sammelgels betrug 1 cm. Auf einer Gelbreite von 11 cm konnten 12 Proben aufgetragen werden. Die Geldicke betrug 1 mm.

Kammerpuffer: Tris	6,0 g
Glycin	28,8 g
H ₂ O	ad 1000 ml pH 8,4

Dieser Puffer wurde zum Gebrauch 10 mal verdünnt.

Das Inkubationsgemisch für die spezifische Anfärbung der Lactatdehydrogenase bestand aus folgenden Komponenten:

Na-D-L-Lactat	0,392 g	in 3,5 ml H ₂ O
NAD	30 mg	in 3,5 ml H ₂ O
NBT	9 mg	in 9 ml H ₂ O
PMS	1 mg	in 1 ml H ₂ O
NaCl	0,584 g/100 ml H ₂ O	4 ml
MgCl	0,101 g/100 ml H ₂ O	4 ml
Tris-HCl	0,5 M pH 8,6	12 ml

Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 37° C während 10 bis 20 min im Dunkeln.

3.2. Isoelektrische Fokussierung

Es wurden jeweils 5 µl eines Homogenates einer einzelnen Kaulquappe in H₂O bidest. aufgetragen.

Ampholyt : PharmalyteTM pH 3 - 10 (Pharmacia)

Apparat : Multiphor LKB 2117

Gel : Nach Bulletin 5/1979: Separation News, Pharmacia
Fine Chemicals. (Vesterberg 1975)

Trennbedingungen : 1 ½ Stunden bei 2000 V, 30 W const.

Inkubation : Wie oben beschrieben.

Densitogramme wurden mit einem Beckmann-Densitometer
Modell CDS-200 aufgenommen.

4. Aminosäureanalyse

Die zu testenden freien Aminosäuren wurden entweder aus Ganztieren, Därmen oder Restkörpern, d.h. Ganztier ohne Darm, durch Methanolextraktion isoliert. Eine von Test zu Test verschiedene Anzahl Larven oder Organe wurden in 200 µl Methanol abs. mit einem Sonifier (Branson Cell Disruptor B 15) homogenisiert. Nach Zentrifugation in einer Eppendorf- Tischzentrifuge (Typ 5412) während 15 min wurde der Ueberstand in eine Ampulle gegeben, das Sediment 1 mal mit 80 % Methanol, 1 mal mit 100 % Methanol nachgewaschen und die Ueberstände nach Zentrifugation mit dem ersten Ueberstand vereinigt. Die gesammelten Ueberstände wurden am Rotationsverdampfer bei 30° C bis zur Trockene eingeeengt und anschließend in 500 µl H₂O bidest. aufgenommen. Zur Analyse wurden diese Proben mit 0,2 M Na-Citrat pH 2,2, 500 µl, angesäuert.

Die freien Aminosäuren wurden mit einem automatischen Aminosäureanalysator Beckmann Multichrom Liquid Column Chromatograph 4255 über die Säule für physiologische Lösungen aufgetrennt (siehe Chen 1977).

5. Immunologische Untersuchungen

5.1. Gewinnung der Antiseren

Es wurden Antikörper gegen Gesamtserumproteine von Rana ridibunda und Rana lessonae hergestellt. Die ersteren stammten aus dem Ausland (Balkan), lessonae aus Biotop D.

Es wurde je zwei Tieren beider Phänotypen Blut entnommen und dieses über Nacht bei 4° C stehen gelassen. Anderntags konnte das Serum abpipettiert werden. Dieses wurde ohne weitere Behandlung zur Immunisierung verwendet. Der Proteingehalt der Seren wurde mit der Biuretmethode (Gornall et al. 1949) bestimmt.

Zur Immunisierung wurden Hasenkaninchen verwendet, welche nach folgendem Plan behandelt wurden:

1. Injektion: Das Antigen (Serum) wurde in Form einer Emulsion in ca. 20 Stellen auf der linken Körperseite der Kaninchen subcutan gespritzt. Die Emulsion bestand dabei aus 330 µg Protein in 0,5 ml Phosphatpuffer (PBS) und je 0,25 ml Freund adjuvant incomplete und complete.

Nach 14 Tagen erfolgte die zweite Injektion in die rechte Körperseite und mit einer Emulsion von 500 µg Protein in 0,5 ml PBS und 0,5 ml Freund adjuvant incomplete.

Booster: Nach 14 Tagen folgte eine weitere intravenöse Gabe von 1500 µg Protein in 1 ml PBS in die Ohrvene. Gleichzeitig mit diesem Booster wurde eine Probeblutung gemacht, um den bereits aufgebauten Antikörpertiter zu bestimmen.

11 Tage nach dem Booster konnte Blut für die Antiserumgewinnung entnommen werden. Die Titer des Antiserums wurden durch Ouchterlony-Doppeldiffusionstest bestimmt (Ouchterlony 1967).

5.2. Ouchterlony-Test

Als Trägermedium wurde 0,8 % Special Agar-noble (Difco) in PBS verwendet. Der aufgekochte Agar wurde in Plasticpetrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm gegossen (15 ml). Die Löcher für die Proben wurden mit einem eigens für diesen Zweck im Hause gebauten Werkzeug mit folgenden Dimensionen ausgestanzt: Zentrales Loch: 5 mm Ø, 6 periphere Löcher: 4 mm Ø, Abstand vom zentralen zu den peripheren Löchern: 3,5 mm.

5.3. Zweidimensionale Immunelektrophorese

Qualitative und quantitative Unterschiede in den antigenischen Proteinfractionen lassen sich am genauesten mit der zweidimensionalen Immunelektrophorese erfassen (Crowle 1973)

75 x 46 mm grosse Objektträger wurden mit einer Schicht 0,2 % Agarose in H_2O bidest. bedeckt, indem die im Tauchverfahren benetzten Objektträger auf einem Heiztisch bei $80^{\circ}C$ getrocknet wurden. Die dabei entstandene, sehr dünne Agaroseschicht verhindert das Ablösen des künftigen Agarosegels vom Objektträger. Auf die so vorbereiteten Objektträger kann anschliessend im Sandwich-Verfahren das 0,5 mm dicke Gel gegossen werden. Gelzusammensetzung: 1 % Ready-agarose Typ BW in Barbital-Na-Puffer 0,025 M, pH 8,2. (3,96 g Barbital-Na, 770 ml H_2O bidest., 230 ml 0,025 n HCl). Der obere, silikonisierte Objektträger konnte nach einer Erstarrungszeit von 30 min bei $4^{\circ}C$ leicht weggeschoben werden.

Für den Probenauftrag wurde 5 mm vom Längsrand und 12 mm vom Querrand des Geles ein Loch mit 4 mm Durchmesser gestanzt. Die Proben (Antigene) wurden auf verschiedene Arten zubereitet:

1. Serum von adulten Fröschen: Wie die Seren zur Immunisierung zubereitet. Aufgetragen wurden jeweils 5 μ l Serum und 5 μ l Barbital-Na-Puffer.

2. Serum von Kaulquappen: Den Kaulquappen wurden ca. 15 μ l Blut direkt aus dem Herzen entnommen und in einer Eppendorf-Zentrifuge 15 min zentrifugiert. Vom überstehenden Serum wurden 10 μ l aufgetragen.

3. Antigene aus Totalhomogenaten: Je eine Kaulquappe wurde in 0,5 ml 1:200 verdünntem Veronalpuffer homogenisiert, 15 min zentrifugiert, der Ueberstand mit 0,5 ml Veronal-Na-Puffer (1:200), also total 1 ml über Sephadex G-25 M (Pharmacia columns PD 10) entsalzt und das Eluat (4 ml) im Rotationsverdampfer getrocknet. Die Proteine wurden anschliessend in 40 μ l H_2O bidest. aufgenommen. Von dieser Lösung wurden je 10 μ l pro Gel aufgetragen. Die Ent-

salzung der Proben und die Einstellung ihrer Molarität entsprechend dem Wert des Laufpuffers ist von sehr grosser Bedeutung für die elektrophoretische Trennung. Proben, welche zu konzentriert sind, verdünnen sich während der Elektrophorese aus osmotischen Gründen und nehmen dabei so stark an Volumen zu, dass sie nicht mehr Platz finden in dem Auftragsloch und sich somit über ganze Teile der Geloberfläche ausbreiten.

Die erste Dimension der Elektrophorese beanspruchte 1 Stunde 40 min bei 12 V (const.) pro cm. Der Elektrodenpuffer bestand an Anode und Kathode jeweils aus 0,5 l 0,025 M Veronal-Na. Der Lauf erfolgte sowohl in der ersten, wie auch in der zweiten Dimension mit der Schichtseite nach unten, um das Austrocknen zu verhindern. Als Pufferbrücken dienten Whatmann No 3- Filterpapierstreifen, welche in 3 Lagen auf eine Plexiglasscheibe gelegt wurden.

2. Dimension: Nach erfolgter Elektrophorese in der Längsrichtung des Objektträgers wurde das Agarosegel bis auf einen Streifen von 10 mm entfernt. In dem verbleibenden Streifen liegen die aufgetrennten Antigene als Banden. Der entfernte Gelteil wurde durch ein wiederum im Sandwich-Verfahren angegossenes Gel mit derselben Zusammensetzung wie in der ersten Dimension ersetzt. Zusätzlich wurde aber der noch warmen, flüssigen Agarose bei 56° C das Antiserum beigemischt. Als optimale Antikörperkonzentration erwiesen sich 40 µl Antiserum pro 2 ml Gellösung. Die Elektrophorese in der zweiten Dimension erfolgte mit 5,5 V pro cm während 3 Stunden.

Nach erfolgter Elektrophorese blieben die Objektträger während 24 Stunden bei 4° C in einer Feuchtkammer. Die Antigen-Antikörperpräzipitate werden nach dieser Behandlung viel besser sichtbar.

Die nicht präzipitierbaren Proteine wurden anschliessend während mindestens 24 Stunden bei Zimmertemperatur in PBS ausgewaschen. Die Färbung der Präzipitate erfolgte in 0,1 % Coomassie-Blue, Typ R-250, in 450 ml Methanol, 450 ml H₂O und 90 ml Eisessig.

6. Erythrozyten

Der Durchmesser der Erythrozyten kann als Mass für den Ploidiegrad verwendet werden (Uzzell et al. 1975) Dabei gelten Individuen, welche Erythrozyten mit einem Durchmesser von 29,38 μm und mehr aufweisen, als triploid.

Es wurden von 10 Elterntieren je 50 Erythrozyten und von je 5 Kaulquappen aus 3 Kreuzungen je 10 Erythrozyten vermessen.

Die Messung erfolgte mit einem Wild M-20 Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung.

7. Gewichtszunahme und Entwicklungsgeschwindigkeit

Es bestehen recht grosse Unterschiede in der Entwicklungsgeschwindigkeit von letalen Kaulquappen im Vergleich mit vitalen Kontrollen. Die Messung der Gewichtszunahme von Kaulquappen verschiedener Kreuzungen bietet die Möglichkeit, festzustellen, von welchem Zeitpunkt der Ontogenese an sich die Letalität bemerkbar macht.

Das Gewicht wurde bestimmt, indem je 10 Kaulquappen von verschiedenen Kreuzungen in einem kleinen Gefäss mit Hilfe von Filterpapier getrocknet wurden. Die Auswahl dieser Stichproben erfolgte zufällig.

Auf morphologische Entwicklungsdifferenzen wird vor allem im Kapitel Parabiose eingegangen.

8. Thyroxinversuch

Da Thyroxin in der Metamorphose eine zentrale Rolle spielt (Moser 1950) war es naheliegend, die Reaktionsbereitschaft von letalen Kaulquappen im Vergleich mit vitalen Kontrollen zu prüfen.

Wir wählten aus zwei Kreuzungen je eine Stichprobe von 100 Tieren aus. Kreuzung A: Rana esculenta x Rana esculenta_C, Kreuzung B: Rana esculenta_C x Rana lessonae_D.*)

*)Die Indices bezeichnen die Herkunft der Elterntiere.

Diese Stichproben wurden aufgeteilt in je 4 Becken à 25 Kaulquappen und 5 l Wasser. Zu diesem Zuchtwasser wurde das Thyroxin gegeben, so dass die Endkonzentrationen 1 : ∞ , 1 : 200 Millionen, 1 : 100 Millionen und 1 : 50 Millionen betrugen. Fütterung und Wasserwechsel erfolgte alle zwei Tage.

Die Behandlung setzte am 30. Tag nach Laichdatum ein. Die vitalen Kaulquappen zeigten zu diesem Zeitpunkt bereits Hinterbeinknospen von ca. 1 mm Länge, während bei den letalen die Hinterbeinanlagen erst knapp durchschimmerten. Die Beobachtungsphase erstreckte sich über einen Monat. Während dieser Zeit wurde das Gewicht der Kaulquappen der einzelnen Ansätze in regelmässigen Abständen bestimmt als Durchschnittsgewicht von 10 Tieren. Ueberdies wurde das Fortschreiten der Metamorphose erfasst, indem die Hinterextremitätenlänge in regelmässigen Abständen gemessen wurde.

9. Histologische Präparationen

Da letale Kaulquappen schon früh in ihrer Entwicklung gewisse Anomalien morphologischer Art aufweisen, wollten wir durch histologische Dünnschnitte eventuelle Missbildungen der inneren Organe nachweisen. Die angewendete histologische Technik bestand in einer Fixierung in Bouin'scher Lösung. Die Einbettung erfolgte in Paraplast. Die mit einem Schlittenmikrotom hergestellten Schnitte von 7 μ m wurden einer Hämalaun-Eosin-Färbung unterzogen und in Malinol eingeschlossen. Die photographischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Photomikroskop III gemacht.

III. RESULTATE

1. Parabiose

1.1. Uebersicht über das Gesamtexperiment

Es wurden 10 Kreuzungen in verschiedenen Kombinationen zu Parabiosen verarbeitet. Total wurden 150 Parabiosen hergestellt und diese in Serien und Klassen eingeteilt. Diese Einteilung erfolgte nach folgenden Gesichtspunkten: Die Genotypkombination bestimmte die Zugehörigkeit zu einer Klasse. Dabei wurden die folgenden Genotypen berücksichtigt: $E \times E$ letal, $E \times E$ Durchbrenner, $E \times L$, $L \times L$. (Erklärungen siehe Abkürzungsverzeichnis) Die Zugehörigkeit zu einer Serie wurde bestimmt durch die geographische Herkunft der Parabiosepartner. Eine Serie beinhaltet im Allgemeinen 10 einzelne, identische Parabiosen, welche gleichzeitig operiert wurden. Tabelle 2 bietet eine Uebersicht über die Parabioseklassen und -Serien.

Die Klassen Ia und IIa beinhalten die Durchbrennerkreuzung ExE_{A_2} , weshalb sie gesondert von den Klassen I und II besprochen werden.

Die Klasse I beinhaltet Parabiosen von letalen mit letalen, Klasse II solche von letalen mit vitalen "heterozygoten", Klasse III solche von letalen mit vitalen "homozygoten" Kreuzungen.

1.2. Entwicklung der einzelnen Parabioseserien

Serie A: $ExE_C + ExE_B$

ExE_B entwickelte sich langsamer, hatte in 4 Fällen verkrüppelte, gekrauste Schwänze. Nur in zwei Fällen führten nicht verheilte Operationswunden zum Tode. 7 Parabiosen starben zwischen dem 5. und dem 12. Tag nach der Operation. Bei 4 von diesen 7 kann der Partner ExE_B als Todesursache angenommen werden.

Tab. 2: Zusammenstellung der Parabiioseklassen und -Serien

Klasse	Serie	Genotyp	Laichdat	Genotyp	Laichdat	n	Opsdat
I	A	ExE _C	17.5.	ExE _B	15.5.	10	18.5.
	B	ExE _C	17.5.	ExE _B	15.5.	8	20.5.
	H	ExE _C	17.5.	ExE _{A1}	20.5.	10	23.5.
Ia	J	ExE _{A2*}	29.5.	ExE _{A3}	30.5.	10	1.6.
	K	ExE _{A2*}	29.5.	ExE _{A3}	30.5.	10	1.6.
II	D	ExE _C	17.5.	ExL _{D1}	19.5.	10	23.5.
	E	ExE _{A1}	20.5.	ExL _{D1}	19.5.	10	23.5.
	N	ExE _D	1.6.	ExL _{D2}	2.6.	10	5.6.
	P	ExE _{A3}	30.5.	ExL _{D2}	2.6.	10	4.6.
IIa	L	ExE _{A2*}	29.5.	ExL _{D2}	2.6.	10	4.6.
III	F	ExE _C	17.5.	LxL _{D1}	20.5.	10	23.5.
	G	ExE _{A1}	20.5.	LxL _{D1}	20.5.	10	23.5.
	M	ExE _{A3}	30.5.	LxL _{D2}	2.6.	10	4.6.
	O	ExE _D	1.6.	LxL _{D2}	2.6.	10	4.6.
Kontr.	C	ExL _{D1}	19.5.	LxL _{D1}	20.5.	10	23.5.

ExE = letale Kreuzungen *= Durchbrenner

übrige = vitale Kreuzungen

Ein weiteres Paar starb am 17. Tag nach der Operation ohne ersichtlichen Grund.

Ein Paar starb am 22. Tag nach der Operation, weil kein Darmausgang gebildet wurde. Das Peritoneum war aufgeplatzt, weil die Tiere zwar frassen, den Kot aber nicht abgeben konnten.

Die Ueberlebensdauer ist in in Abbildung 2 dargestellt.

Serie B: ExE_C + ExE_B

Vor 8 operierten Paaren hielt eines nicht zusammen. Drei Paare starben zwischen dem 3. und dem 11. Tag nach der Operation, wobei der Partner aus Biotop B die Todesursache darstellte. Die Entwicklungsgeschwindigkeit war, bis auf die drei erwähnten früh gestorbenen, ungefähr gleich, jedoch war der Partner aus Biotop C in 7 Fällen grösser als derjenige aus Biotop B.

1 Paar wurde am 25. Tag nach der Operation fixiert.

Ein weiteres Paar starb ohne ersichtlichen Grund am 31. Tag nach der Operation, ein weiteres hatte 40 Tage nach Laichdatum ein Loch im Peritoneum und wurde fixiert.

Das letzte Paar starb ohne ersichtlichen Grund nach 48 Tagen. Das letzte überlebende Einzeltier aus nicht verheilten Parabiosen starb im Alter von 68 Tagen.

Die Ueberlebensdauer ist in Abbildung 2 dargestellt.

Serie C: ExL_{D1} + LxL_{D1}

Diese Serie dient der Kontrolle, da hier zwei vitale Partner kombiniert wurden. Die Entwicklungsgeschwindigkeit dieser beiden Kreuzungen wies nur geringe Differenzen auf, wobei sich im allgemeinen die homozygoten Partner schneller entwickelten. Sehr oft zeigten aber gerade diese Partner morphologische Missbildungen, welche sonst nur bei letalen Kreuzungen beobachtet werden können. So waren in 3 Fällen die Flossensäume gekräuselt und die Schwänze aufgebogen.

Nur zwei Parabiosen entwickelten einen funktionstüchtigen Magen-Darm-Trakt und diese beiden überlebten denn auch

am längsten.

Zwei Parabiosen zerfielen 4, respektive 5 Tage nach der Operation aus unersichtlichen Gründen.

Die übrigen Paare starben zwischen dem 19. und dem 34. Tag nach der Operation, wobei nicht zu ermitteln ist, welcher Partner jeweils zum Tode führte (siehe Abb.4).

Serie D: $\text{ExL}_{D1} + \text{ExE}_C$

5 Parabiosen erreichten das Alter des Fütterungsbeginnes nicht und starben vorher ohne ersichtlichen Grund. Der vitale Partner entwickelte sich schneller und war grösser als der letale.

Die übrigen Parabiosen starben zwischen dem 20. und 40. Tag nach der Operation, wobei immer mit grosser Wahrscheinlichkeit der letale Partner die Todesursache darstellte (siehe Abb. 3).

Serie E: $\text{ExL}_{D1} + \text{ExE}_{A1}$

6 Parabiosen erreichten das Alter des Fütterungsbeginnes. Im Zeitpunkt der Operation, also als Schwanzknospen, wiesen die beiden Partner nur unwesentliche Differenzen in Bezug auf Grösse und Entwicklungsstadium auf. Bei allen Parabiosen, welche länger als zwei Wochen lebten, entwickelte sich der linke Partner schneller und wurde grösser als der letale. Bei den früh verstorbenen Paaren lässt sich nichts aussagen über die Todesursache. Bei den 6 länger lebenden jedoch war in einigen Fällen ein Herzstillstand des letalen Partners zu beobachten, während der vitale noch keine Anzeichen des Todes zeigte. Alle 6 langlebigen Parabiosen hatten einen normalen Verdauungstrakt mit Anus, weshalb die Todesursache hier nicht in der mangelnden Nahrungsaufnahme zu suchen ist (Abb.3)

Serie F: $\text{ExE}_C + \text{LxL}_{D1}$

2 Parabiosen zerfielen wegen nicht verheilten Wunden 5 und 6 Tage nach der Operation. 3 weitere Paare zerfielen

ohne ersichtlichen Grund schon früher, nämlich am 2. und 3. Tag.

Die Larven waren in einem sehr frühen Schwanzknospenstadium (Stad. 14-15), als sie operiert wurden. Ob dieser frühzeitige Eingriff den Erfolg reduziert, ist fraglich, da sich andere Parabiosen dieser Serie normal entwickelten.

4 Parabiosen starben im Alter von 34 bis 51 Tagen. In 3 Fällen war eindeutig ExE_C vor LxL_{D1} tot und wies auch die typischen Anzeichen von letalen Kaulquappen auf. In einem Fall wurde kein Anus gebildet (siehe Abb. 4).

Serie G: $LxL_{D1} + ExE_{A1}$

In dieser Serie war auffallend, dass keine Parabiosen sehr früh, das heisst innerhalb der ersten Woche nach der Operation starben. Alle überlebten den Fütterungsbeginn und die Letalkrise begann erst 30 Tage nach der Operation, wobei innerhalb von 10 Tagen alle Parabiosen starben. Bei einem Paar leiteten innere Blutungen im Rumpfbereich und in der Schwanzspitze die Krise ein. Solche Blutlakunen wurden auch bei einigen andern Parabiosen gefunden (siehe Abb. 4).

Serie H: $ExE_C + ExE_{A1}$

Nur zwei Parabiosen dieser Serie zeigten sehr frühe Krisen, welche auf ExE_C zurückzuführen waren. Die restlichen 8 Paare starben nach 36 bis 48 Tagen. Die Entwicklungsgeschwindigkeit und Grösse war für beide Partner gleich (siehe Abb. 2).

Serie J: $ExE_{A2} + ExE_{A3}$

Diese Serie zeichnete sich durch eine sehr frühe Krise aus, die 7 Parabiosen im Alter von 16 bis 18 Tagen erfasste. Es war in allen Fällen der Partner ExE_{A3} , welcher ausgeprägter die Anzeichen von Letalität zeigte. Die 3 länger überlebenden Paare starben zwischen 31 und 42 Tagen. Auffallend für ExE_{A3} waren die kleinen Augen und die total verkrüppelten

Schwänze. Während bei der Operation und in den ersten zwei Wochen danach der Partner ExE_{A3} wesentlich grösser war, entwickelte sich ExE_{A2} schneller und wurde eher grösser als ExE_{A3} (siehe Abb. 2).

Serie K: $\text{ExE}_{A2} + \text{ExE}_{A3}$

2 Parabiosen dieser Serie starben am 8. und 12. Tag nach der Operation, wobei bei einer der Tod durch eine nicht verheilte Wunde verursacht wurde. Im andern Fall liess sich nicht feststellen, weshalb die Parabiose zerfiel. 3 weitere Parabiosen wurden am 8. resp. 14. Tag nach der Operation fixiert.

Eine Gruppe von 5 Parabiosen starb im Alter von 20 bis 29 Tagen, wobei in allen Fällen der rechte Partner, das heisst ExE_{A3} sehr viel schlechter aussah als ExE_{A2} . Dies äusserte sich in Blutungen und verkrüppelten Schwänzen bei ExE_{A3} (siehe Abb. 2).

Serie L: $\text{ExE}_{A2} + \text{ExL}_{D2}$

Da in dieser Serie ein vitaler Partner mit einem Durchbrenner gepaart wurde, war zu erwarten, dass die Lebensdauer dieser Parabiosen gegenüber Serien mit einem vitalen und einem letalen Partner grösser sein würde. Dies war tatsächlich der Fall, wenn man mit den Serien N, O und P vergleicht. Alle Parabiosen starben im Zeitraum von 20 Tagen, wobei einzig festgestellt werden kann, dass der Partner ExL_{D2} , also der vitale, sich einerseits schneller entwickelte und dabei auch stets wesentlich grösser war als der Durchbrenner. Die Differenz in der Lebensdauer zwischen Parabiosen, welche Kot aufwiesen und solchen, die kein After gebildet hatten, war im Durchschnitt 9 Tage (siehe Abb.3).

Serie M: $\text{ExE}_{A3} + \text{LxL}_{D2}$

Alle Parabiosen dieser Serie wurden vor dem Eintritt des Todes entweder fixiert oder tiefgekühlt (siehe Abb.4).

Serie N: ExE_D + ExL_{D2}

Der letale Partner war in dieser Serie immer wesentlich kleiner und wies in allen Fällen Zeichen der Letalität auf. 4 Parabiosen verheilten nicht und entwickelten sich als Kontrollen in Form von scheinoperierten Einzeltieren. Es zeigte sich, dass in 2 Fällen der Partner ExL_{D2} alle Parabiosen überlebte (siehe Abb. 3).

Serie O: ExE_D + LxL_{D2}

7 Parabiosen dieser Serie wurden zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert oder tiefgekühlt. Die restlichen 3 Paare wurden 31 bis 43 Tage alt. Auffallend war die gelbe Farbe des vitalen Partners, welche offenbar durch Stoffwechselprodukte entstanden sein muss. Die mittlere Lebensdauer der Parabiosen lag über derjenigen von Kontrollen von ExE_D. Dies gilt übrigens auch für die Serien E, F, G, N und P). Ob aus dieser Tatsache eine signifikant lebensverlängernde Wirkung des vitalen Partners abzuleiten ist, müssen die statistischen Tests zeigen (siehe S.36 und Abb.4)

Serie P: ExE_{A3} + ExL_{D2}

5 Parabiosen wurden im Alter von 10 bis 12 Tagen nach der Operation fixiert oder tiefgekühlt. Von den verbleibenden 5 Paaren starb eines schon 5 Tage nach der Operation ohne ersichtlichen Grund, während bei den übrigen 4 jeweils der letale Partner sehr viel kleiner war, kleinere Augen hatte, einen verkrüppelten Schwanz aufwies und letztlich auch immer für den Tod verantwortlich war (siehe Abb. 3).

1.3. Vergleich der Lebensdauer von Kontrolltieren zu Parabiosen

Die Lebensdauer der Parabiosen wurde folgendermassen ermittelt: Von jeder Serie (n= 10) wurde die mittlere Ueberlebensdauer von Parabiosen errechnet, die ohne ersichtlichen morphologischen Schaden starben. Parabiosen, welche innerhalb der

ersten Woche nach der Operation starben, wurden nicht mitgerechnet, da hier sehr oft nicht geheilte Operationswunden zum Tode führten. Die Anzahl Lebenstage wurde vom Laichdatum bis zum Todestag bestimmt.

Die Lebensdauer der Kontrollen wurde ermittelt, indem vom Laichdatum an die Tage gezählt wurden, bis von allen Kontrollen nur noch die Hälfte lebte.

Als Diskussionsbasis kann die Serie C angenommen werden, mit einer mittleren Ueberlebensdauer von 35,5 Tagen (Abb. 4).

1.4. Betrachtung der einzelnen Parabioseklassen

Klasse I: Die durchschnittliche Lebensdauer aller Parabiosen dieser Klasse betrug 35 Tage. In nur 6 Fällen überlebten die Parabiosen den Zeitpunkt des Todes der Kontrollen. Die Mehrheit der Parabiosen starb aber vor dem Tod der Kontrollen. Die durchschnittliche Lebensdauer von Serie C und Klasse I ist nicht signifikant verschieden. Diese Tatsache steht im Widerspruch zur Erwartung, dass die letalen wesentlich vorher sterben würden.

Klasse Ia: In dieser Klasse war der eine Partner jeweils ein Durchbrenner, womit zu erwarten war, dass die Serien J und K sich entsprechend den Serien der Klasse II verhalten würden. Die Aussagekraft der Serien J und K ist schwach, weil nur sehr wenige Parabiosen den Fütterungsbeginn überlebten und nur 1 Paar einen normalen Verdauungstrakt aufwies. Die durchschnittliche Ueberlebensdauer der Klasse Ia beträgt 21 Tage und ist somit wesentlich kürzer als bei der Parabiose der Klasse II. Dieser Befund zeigt, dass auch Durchbrennerkreuzungen gegenüber Kontrollen des Genotyps ExL eine reduzierte Vitalität aufweisen. Andere Beobachtungen bestätigen diesen Befund: Die Gewichtszunahme im Verlaufe der Embryogenese verläuft bei Durchbrennern schneller als bei letalen Kreuzungen und langsamer als bei vitalen Kontrollen. Die letalen Partner der Serien J und K, welche nicht in Parabiose aufwuchsen, erreichten ein Alter

von 4 Wochen, während die Parabiosen im Alter von rund 3 Wochen starben. Dies zeigt deutlich, dass durch die Parabiose selbst die Ueberlebensdauer reduziert wird.

Klasse II: In der überwiegenden Mehrzahl überlebten die Parabiosen den Zeitpunkt des Todes der letalen Kontrollen. Vor allem in den Serien E, N und P beträgt diese Differenz 12, 13 und 9 Tage, während in der Serie D die Parabiosen durchschnittlich weniger lang lebten als die Kontrollen. Es lässt sich (siehe statistische Auswertung auf S.36) zeigen, dass die Parabiosen der Klasse II signifikant länger leben als die Kontrollen der Serie C, was bedeutet, dass der vitale Partner die Lebensdauer des letalen positiv beeinflusst hat.

Klasse IIa: Die Parabiosen der Serie L (vitale Kreuzung und Durchbrenner) zeigen eine durchschnittliche Ueberlebensdauer von 42 Tagen. Damit liegen sie im Rahmen der Kontrollen oder überleben diese sogar. Da die Stichprobe aber recht gering war ($n = 10$), ist auch die Aussagekraft nicht sehr gross.

Klasse III: In dieser Klasse sind die durchschnittlichen Ueberlebensalter pro Serie 42, 38 und 38 Tage, womit alle Serien etwas länger lebten als die Kontrollen der Serie C (35,5 Tage). Die nicht in Parabiose lebenden Kontrollen dieser Serie lebten 40, 32 und 24 Tage, womit auch in dieser Klasse eine lebensverlängernde Wirkung des vitalen Partners anzunehmen ist (siehe auch Statistik auf S. 36).

Neben dieser zusammenfassenden Darstellung der Resultate der einzelnen Parabioseklassen scheint uns die Betrachtung einiger ausgewählter Einzelschicksale mindestens so wichtig, wenn nicht aufschlussreicher. Vergleicht man die extreme Lebensdauer von einzelnen Parabiosen mit extremen Werten der Kontrollen, welche nicht in Parabiose aufwuchsen, so kommt man zu folgendem Bild:

In der Klasse I überlebte nur 1 Parabiose alle Kontrollen, in den Serien A und B jedoch ist die Lebensdauer der Parabiosen erheblich kürzer als die der Kontrollen.

In der Klasse Ia scheint in einem Fall in der Serie J der Durchbrennerpartner dazu geführt zu haben, dass die Parabiase den Tod der Kontrolle um 11 Tage überlebte. Im anderen Fall der Serie K starb die älteste Parabiase zwei Tage vor der letzten Kontrolle.

In der Klasse II überlebten zwei Parabiosen die Kontrollen um 4, bzw. 12 Tage. Die extrem lange Lebensdauer der Kreuzung ExE_c wurde hier nicht erreicht, sondern die Parabiosen lebten 14 Tage weniger lang als die Kontrollen. Auch hier scheint die Möglichkeit gegeben, dass der vitale Partner lebensverlängernd wirkt.

In der Klasse IIa wurde eine der längsten Ueberlebenszeiten erreicht (51 Tage) und damit das mittlere Lebensalter von Kontrollen der Serie C (35,5 Tage) erheblich überschritten. Die Lebensdauer von 51 Tagen wurde allerdings nur von einer Parabiase erreicht, während die durchschnittliche Lebensdauer dieser Serie 42 Tage beträgt.

In der Klasse III kommen sowohl Unter- als auch Ueberschreitungen des Alters von letalen Kontrollen vor. Die Zahlen weisen aber auch hier auf eine lebensverlängernde Wirkung des vitalen Partners hin.

Die durchschnittliche Lebensdauer von Parabioseserien, Klassen und letalen, einzeln gehaltenen Kontrolltieren ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Abbildung 2: Ueberlebensdauer der Klassen I und Ia.

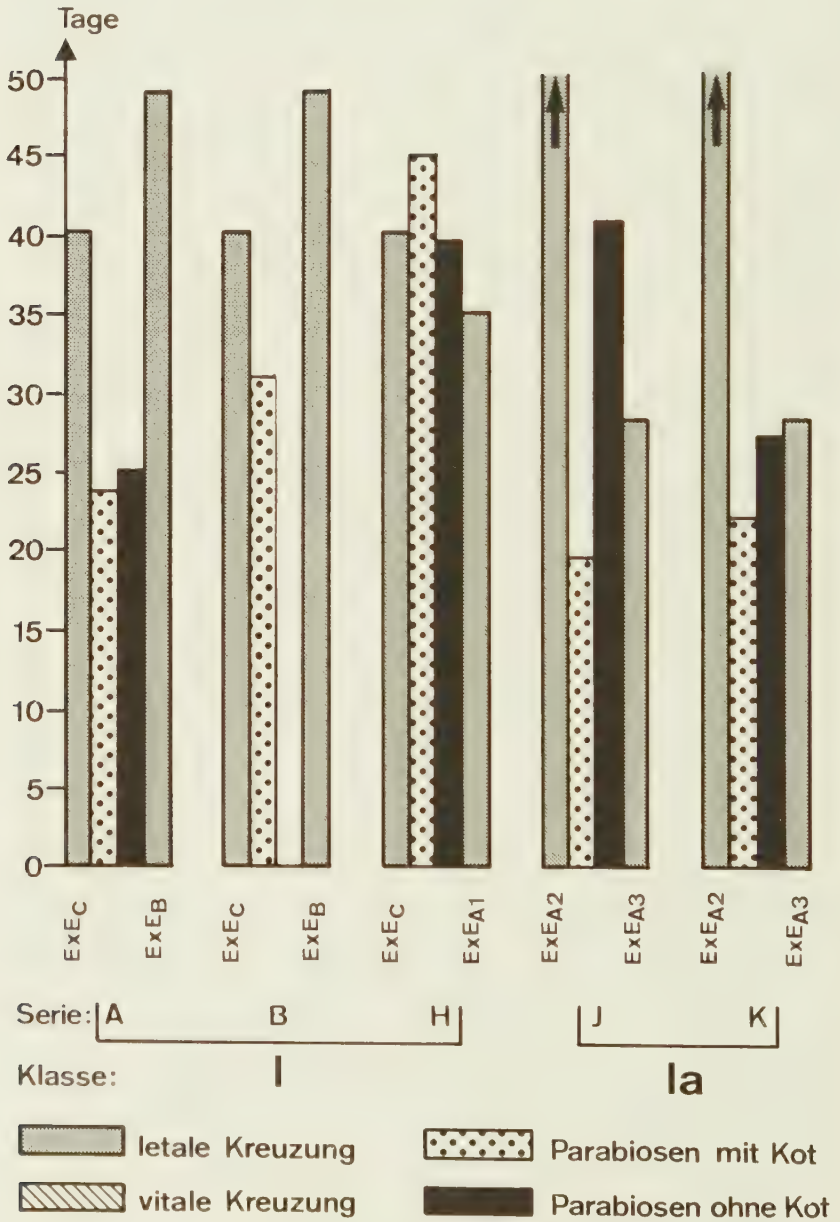


Abbildung 3: Ueberlebensdauer der Klassen II und IIa.

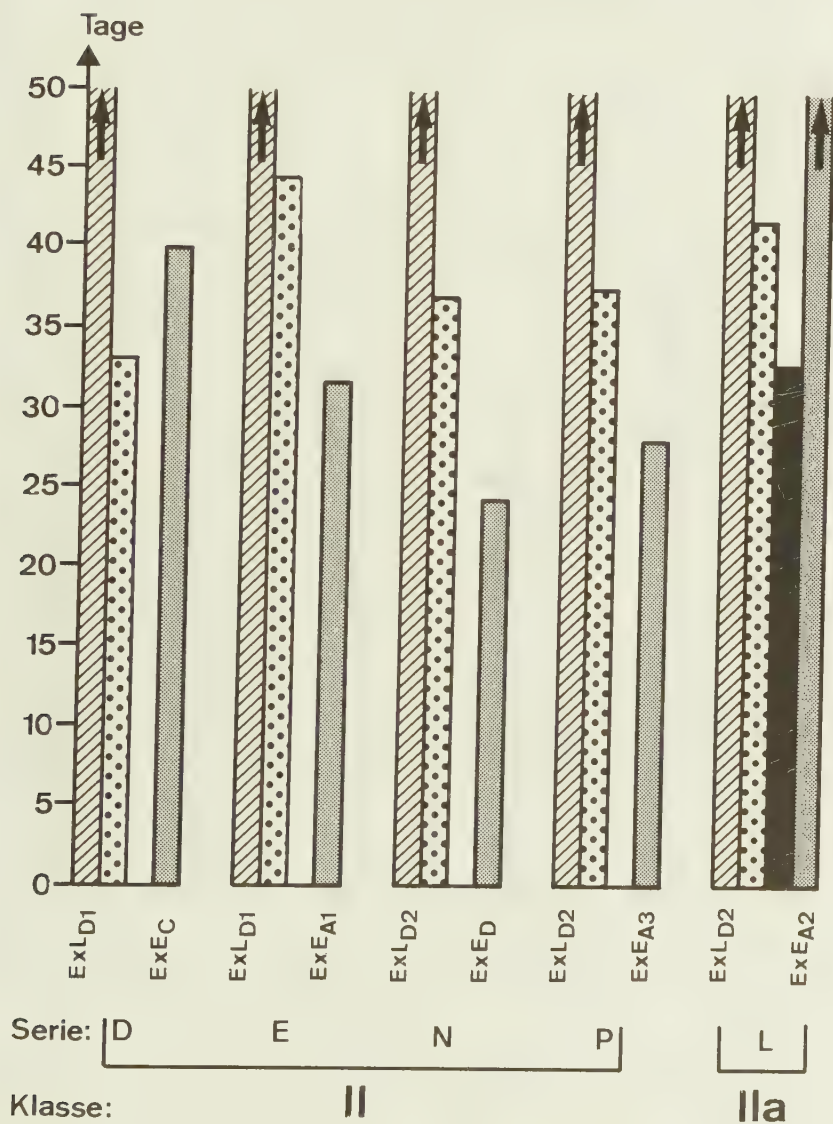
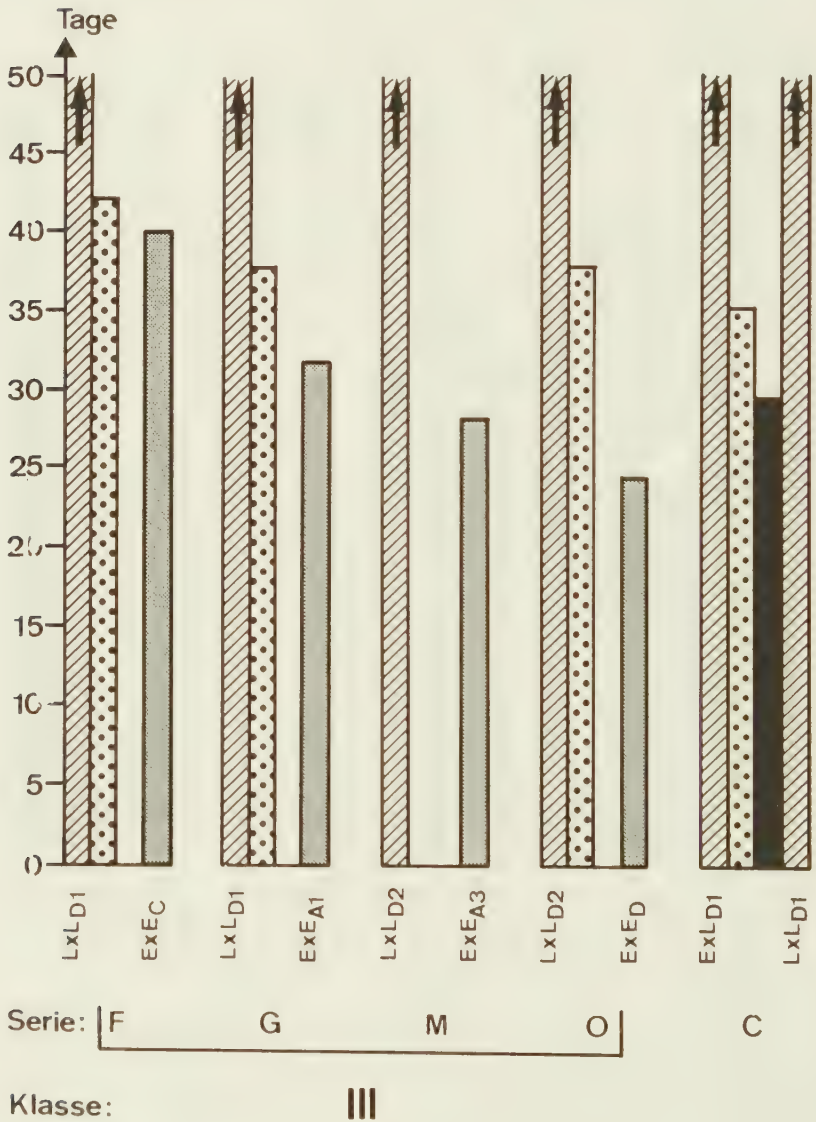


Abbildung 4: Ueberlebensdauer der Klasse III und der Serie C.



Durchschnittliche Ueberlebensdauer											
		der Serie			der Klasse			der letalen Kontrollen			
Klasse	Serie	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	n	Kreuzung	$\bar{x}$	Kreuzung	$\bar{x}$
I	A	23	11	3				ExE _C	40	ExE _B	44
	B	31	14	5	35	13	13	ExE _C	40	ExE _B	44
	H	45	4	5				ExE _C	40	ExE _{Al}	32
Ia	J	19	0	3							
	K	22	6	4	21	5	7	ExE _{A3}	28	Durchbrenner	
II	D	33	9	6				ExE _C	40	vital	
	E	44	3	4				ExE _{Al}	32	vital	
	N	37	6	3	37	10	17	ExE _D	24	vital	
	P	37	15	4				ExE _{A3}	28	vital	
IIa	L	42	6	6	42	6	6	vital		Durchbrenner	
III	F	42	7	4				ExE _C	40	vital	
	G	38	3	7	39	5	13	ExE _{Al}	32	vital	
	O	38	8	2				ExE _D	24	vital	
Kontr.	C	35	3	2	35	3	2	vital		vital	

Tab. 3 : Durchschnittliche Ueberlebensdauer von Parabiose-serien, -Klassen und letalen, einzeln gehaltenen Kontrolltieren. Die Durchschnittswerte sind auf ganze Tage gerundet.

1.5. Illustrationen zum Parabioseversuch

Die Abbildungen dokumentieren die im Kapitel III 1.2, 1.3. und 1.4. erwähnten morphologischen Symptome der Letalität von Rana esculenta inter se - Kreuzungen.

Abbildung 5 zeigt zwei vitale Partner (Serie C). Dieses Bild zeigt, dass durch die Operation selbst keine Unterschiede in der Entwicklung der beiden Partner verursacht werden. (Alter: 38 Tage)

Abbildung 6 a, b, c, d: Die 4 Bilder zeigen dieselbe Parabiose zu verschiedenen Zeitpunkten:

6 a: Alter: 8 Tage. Der linke, letale Partner (ExE_D) ist wesentlich weniger weit entwickelt als der vitale Teil der Parabiose (LxL_{D2}). Dies ist sowohl an den Kiemen als auch an der Augenanlage sichtbar. Der letale Partner zeigt in diesem Stadium die charakteristische Missbildung des Schwanzes. Der Flossensaum ist vor allem an der Schwanzspitze nicht regulär ausgebildet und der Schwanz weist die für letale Kaulquappen typische Knickung auf.

6 b: Alter: 17 Tage. Der Entwicklungsrückstand des letalen Partners äussert sich hier nur durch den Grössenunterschied. Beide Tiere haben Stadium 25 erreicht. Rein morphologisch betrachtet ergibt sich zu diesem Zeitpunkt kein pathologisches Bild für den letalen Partner.

6 c: Alter: 26 Tage.

6 d: Alter: 38 Tage. Der gesamte Bauchraum ist ballonartig aufgeblasen. Der durchscheinende Darm mündet in zwei regulär angelegte Ani, jedoch entspricht die Darmlänge nicht der Erwartung für dieses Entwicklungsstadium.

Abbildung 7: Dieses Bild zeigt "scheinoperierte" Tiere der Serie N ($ExL_{D2} + ExE_D$). Die Verwachungsstelle zwischen den beiden Partnern war zu schwach, so dass sich die beiden Tiere wieder trennten. Sehr auffallend beim linken Tier (ExE_D) ist wiederum der aufgeblähte Rumpf und die relativ kleinen, nahe beieinanderliegenden Augen.

Abbildung 5: Parabiose zwischen zwei vitalen Partnern der Serie C. Beide Partner befinden sich in demselben Entwicklungsstadium.



Abbildung 6a: Erklärungen siehe Seite 30

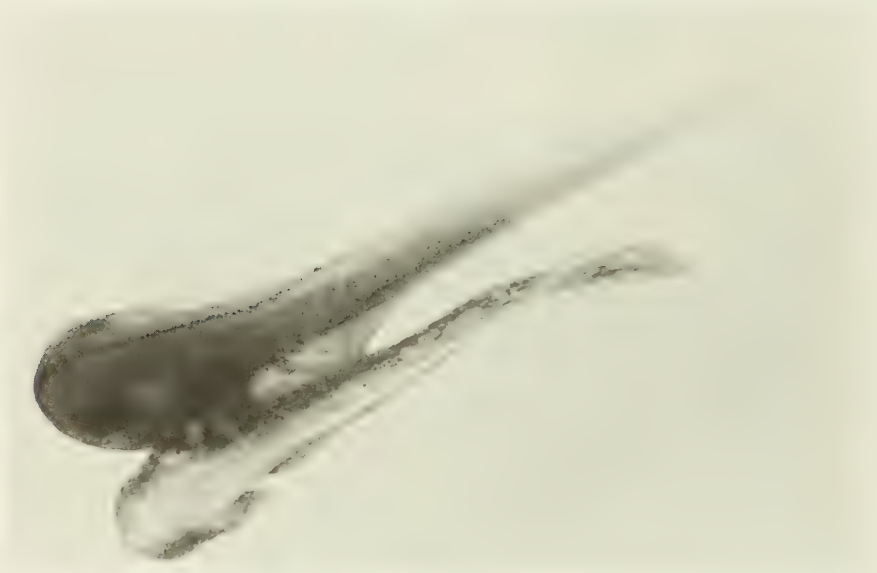


Abbildung 6b:



Abbildung 6c:

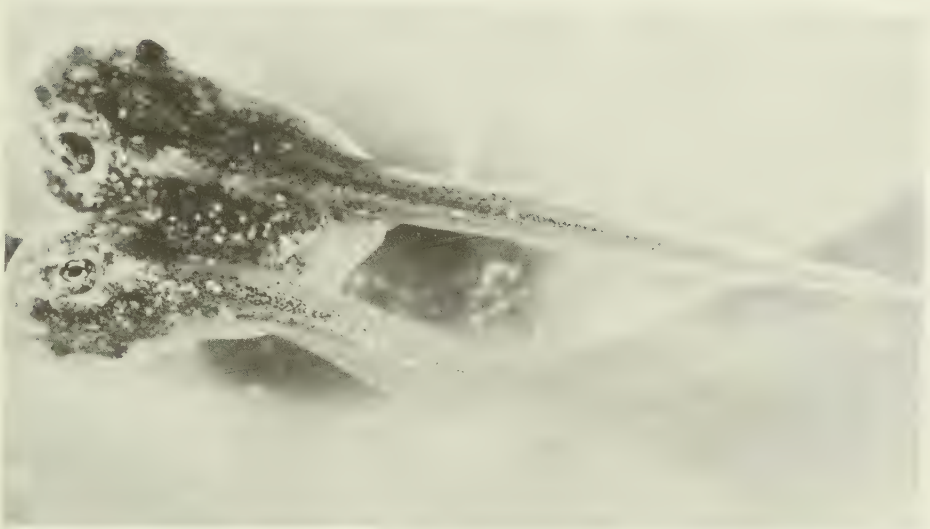
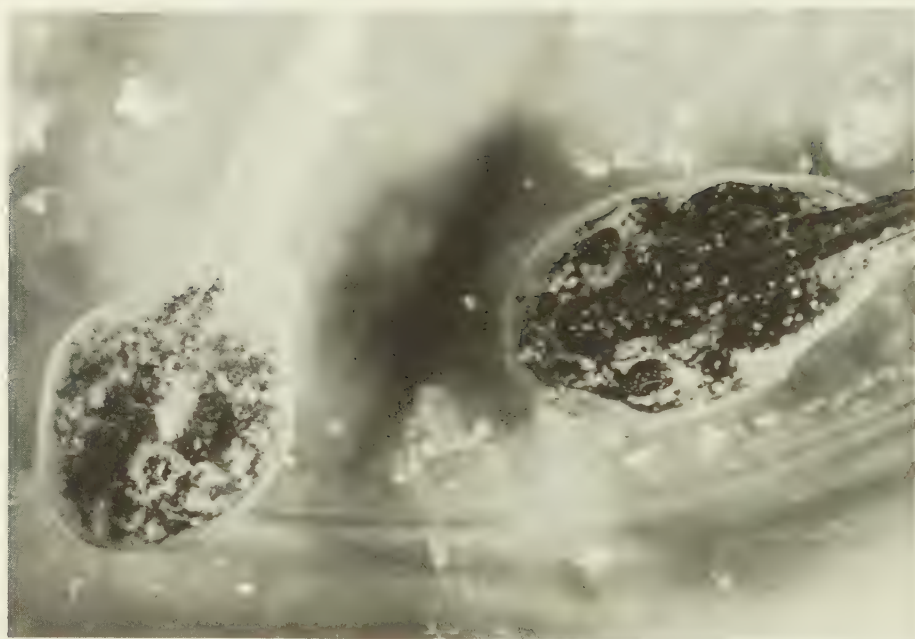


Abbildung 6d:



Abbildung 7:



1.6. Statistischer Anhang zum Parabioseversuch

Fragestellung: Lassen sich aufgrund der registrierten Lebensalter pro Parabioseserie signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Klassen feststellen und entsprechen diese Unterschiede den Erwartungen?

Als Testmethode wurde der t-Test zum Vergleich der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben gewählt. Man setzt voraus, dass alle Stichproben normal verteilten Grundgesamtheiten entnommen wurden und dass diese Grundgesamtheiten das gleiche σ haben.

Die Nullhypothese lautet: $H_0: \mu_x = \mu_y$, wobei μ_x und μ_y die Mittelwerte des erreichten Alters aller Parabiosen von zwei verschiedenen Klassen darstellen.

$$t = \frac{x - y}{\sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} \frac{s_x^2 + s_y^2}{n+m-2}}}$$

Wie Tab. 4 zeigt, tritt nur in 3 Fällen (*1) von getesteten Zahlenverhältnissen ein Widerspruch zwischen Erwartung und empirisch gefundenen Zahlen auf. In einem Fall (*2) konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

Da somit 80 % der getesteten Fälle die Hypothese erfüllen, kann angenommen werden, dass die drei Widersprüche, welche sich durch die statistischen Tests ergaben im Rahmen der biologischen Streuung liegen.

Tab. 4 : Korrelationen zwischen den Serien, respektive Klassen

Klasse : Klasse		Erwartung	Empirische Feststellung	Test P =
I	Ia	<	>	0,001 *1
I	II	<	<	0,001
I	IIa	<	<	0,001
I	III	<	<	0,001
I	C	<	<	nicht signif. *2
Ia	II	<	<	0,001
Ia	IIa	<	<	0,001
Ia	III	<	<	0,001
Ia	C	<	<	0,001
II	IIa	<	<	0,001
II	III	<	<	0,001
II	C	<	>	0,001 *1
IIa	III	>	>	0,001
IIa	C	<	<	0,001
III	C	<	>	0,001 *1

> = x lebt länger als y

< = y lebt länger als x

2. Polymorphismus der Isozyme der Lactatdehydrogenase

Da die Letalität von Kaulquappen des Typs ExE nicht in allen Kreuzungen stark ausgeprägt ist und es zusätzlich diesbezügliche Unterschiede von Biotop zu Biotop gibt, wurde das Isozymmuster der Lactatdehydrogenase systematisch untersucht.

Zur Untersuchung gelangten 12 Kreuzungen, wovon 5 letal und 6 vital waren. Eine Kreuzung überlebte die für ExE erwartete Letalitätskrise und die Kaulquappen gingen in die Metamorphose (Tab. 5)

Die Eltern aller Kreuzungen wurden mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf ihren Genotyp untersucht. Dabei wurden die Resultate von Vogel (1977) als Vergleich herangezogen. Es wurden folgende Voraussetzungen berücksichtigt, die auch von Vogel gemacht wurden: Die Untereinheit A des LDH-Tetramers ist in allen Genotypen identisch. Von der Untereinheit B gibt es 4 Spezies, B^a , B^b , B^c und B^d , welche sich als homomere Tetramere in der genannten Reihenfolge weiter zur Anode bewegen. B^d unterscheidet sich in Bezug auf den R_f -Wert nicht von B^c in Davis-Ornstein-Gelen (Vogel und Chen 1976). Die Untereinheiten B^a und B^c werden nur von lessonae, B^b und B^d nur von ridibunda synthetisiert. Diese Voraussetzungen wurden durch zusätzliche Experimente bestätigt (siehe Abb. 8).

Sowohl die Eltern als auch eine je nach Kreuzung unterschiedliche Zahl von Nachkommen wurde mittels Isoelektrischer Fokussierung (IEF) auf ihren LDH-Genotyp untersucht. Anhand von 24 elterlichen LDH-Isozymmustern, welche einerseits mittels PAGE, andererseits mittels IEF gewonnen wurden, lassen sich die Resultate dieser beiden Techniken miteinander vergleichen. Dabei wird es auch möglich, die mittels PAGE nicht unterscheidbaren Untereinheiten B^c und B^d eindeutig zu trennen. Die LDH-Banden der IEF können dank 2-dimensionaler Elektrophorese ohne weiteres den Banden aus der PAGE des Davis-Ornstein-Systems zugeordnet werden. In der ersten Dimension wurde mittels PAGE, in der zweiten mittels IEF

aufgetrennt (Abb. 9 und 10).

In Bezug auf die B- Untereinheit ist heterozygote Kombination möglich. Daraus lassen sich für die Phänotypen ridibunda, lessonae und esculenta die in Tab. 6 zusammengefassten Genotypen ableiten.

No	♀				♂				F ₁	
	Phäno-Geno- typ	LDH-D typ	Her- Muster	kunft	Phäno-Geno- typ	LDH-D typ	Her- Muster	kunft	Geno IEF- typ	Muster
1	esc	B ^a /B ^b	D VI	C	esc	B ^b /B ^c	D IV	C	B ^b /B ^b	2
2	esc	B ^a /B ^d	D II	C	esc	B ^b /B ^c	D IV	C	B ^d /B ^b	6
									B ^d /B ^c	10
3	esc	B ^a /B ^d	D II	C	esc	B ^c /B ^d	D III	C	B ^d /B ^c	10
4	esc	B ^b /B ^c	D IV	D	esc	B ^a /B ^b	D VI	D	B ^b /B ^b	2
5	esc	B ^a /B ^b	D VI	C	esc	B ^b /B ^c	D IV	C	B ^b /B ^b	2
6*	esc	B ^a /B ^b	D VI	C	esc	B ^c /B ^d	D III	C	B ^c /B ^d	6
7	les	B ^a /B ^c	D II	D	les	B ^a /B ^a	D I	D	B ^a /B ^a	1
									B ^c /B ^a	5
8	les	B ^a /B ^c	D II	D	les	B ^a /B ^a	D I	D	B ^a /B ^a	1
									B ^c /B ^a	5
9	esc	B ^b /B ^c	D IV	D	les	B ^a /B ^a	D I	D	B ^b /B ^a	9
10	esc	B ^a /B ^b	D VI	D	les	B ^a /B ^c	D II	D	B ^b /B ^a	9
									B ^b /B ^c	7
11	esc	B ^a /B ^b	D VI	C	rid	B ^d /B ^d	D III	Ausl.	B ^a /B ^d	8
									B ^b /B ^d	6
12	esc	B ^a /B ^b	D VI	C	les	B ^c /B ^c	D III	D	B ^b /B ^c	7
									B ^a /B ^c	5

*) = Durchbrenner

Tab. 5: Vererbung der LDH-Untereinheiten B in den 12 untersuchten Kreuzungen.

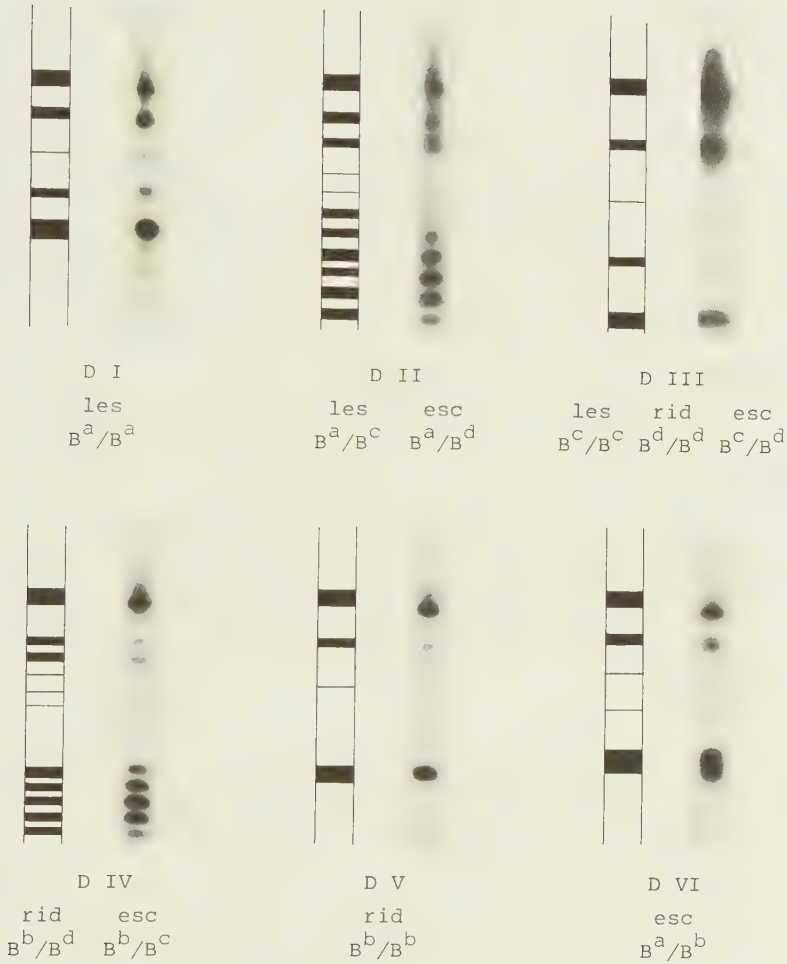


Abbildung 8: Die 6 Grundmuster der LDH im Rana esculenta Komplex, die mit Hilfe des Davis-Ornstein-Systems nachgewiesen werden können, ihr Vorkommen bei den drei Phänotypen und die zugehörigen Genotypen.

Abbildung 9: Zuordnung der Banden von PAGE zu IEF anhand 2-dimensionaler Elektrophorese.

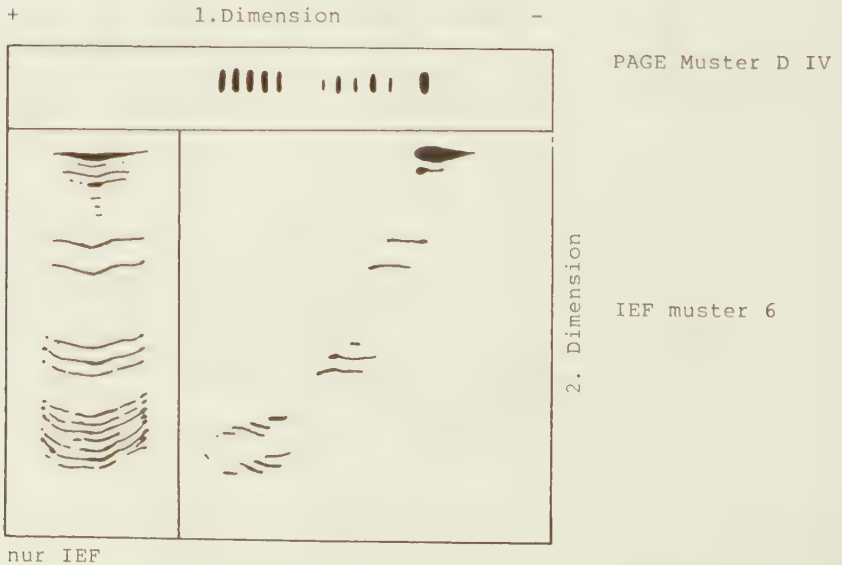
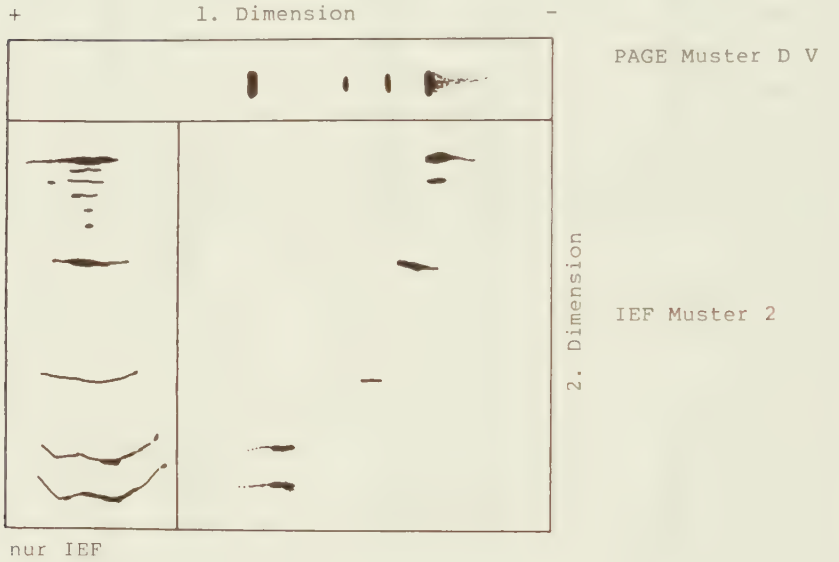
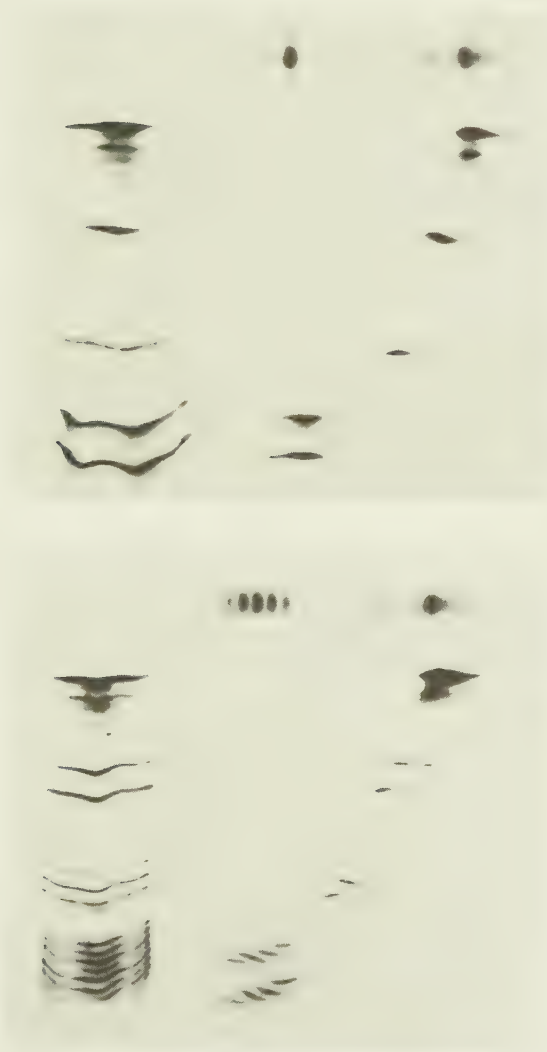


Abbildung 10: Zuordnung der Banden von PAGE zu IEF anhand 2-dimensionaler Elektrophorese. Weitere Erklärungen in Abb. 9 und im Text.



Tab. 6 : Die in den drei Phänotypen vorkommenden LDH-B-Genotypen und die zugehörigen PAGE-Isozymmuster. Für die unterschiedlichen Isozymmuster wurden die von Vogel (1977) verwendeten Bezeichnungen übernommen.

	Phänotyp	Genotyp	Isozymmuster
homozygot	les	B^a/B^a	D I
	rid	B^b/B^b	D V
	les	B^c/B^c	D III
	rid	B^d/B^d	D III
heterozygot	les	B^a/B^c	D II
	rid	B^b/B^d	D IV
	esc	B^b/B^c	D IV
	esc	B^a/B^d	D II
	esc	B^a/B^c	D VI
	esc	B^c/B^d	D III

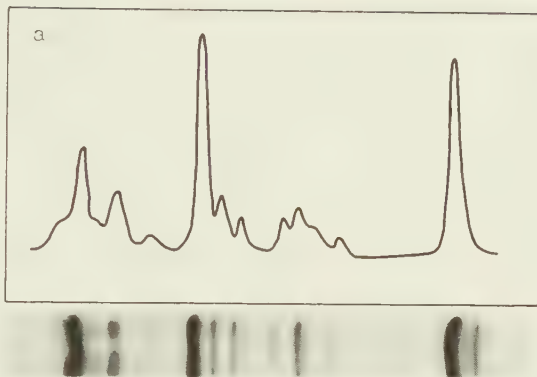
Die Resultate dieses Kapitels sind im wesentlichen in der Tab. 5 und in den Abb. 11 a-k (IEF-Muster) zusammengefasst. Die Analyse dieser Resultate folgt in Kapitel IV 3., wobei die Arbeit von Vogel (1977) weitgehend als Diskussionsbasis verwendet wurde.

IEF-Muster : 1

PAGE-Muster: D I

Genotyp : B^a/B^a Vorkommen :

Kreuzungen 7 und 8

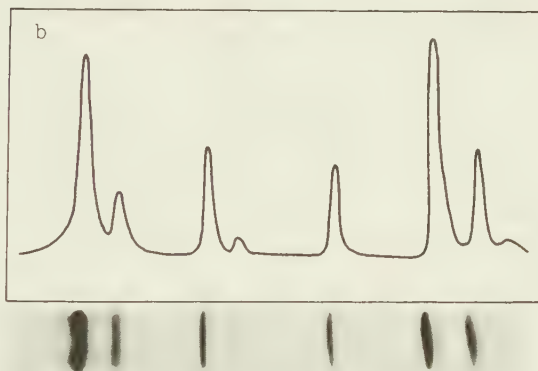


IEF-Muster : 2

PAGE-Muster: D V

Genotyp : B^b/B^b Vorkommen :

Kreuzungen 1, 4, 5

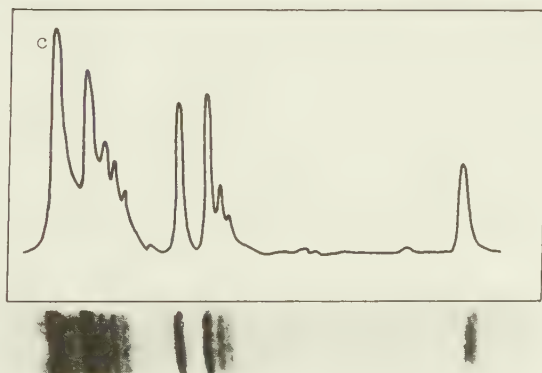


IEF-Muster : 3

PAGE-Muster: D IIII

Genotyp : B^c/B^c Vorkommen :

les, Kreuzung 12

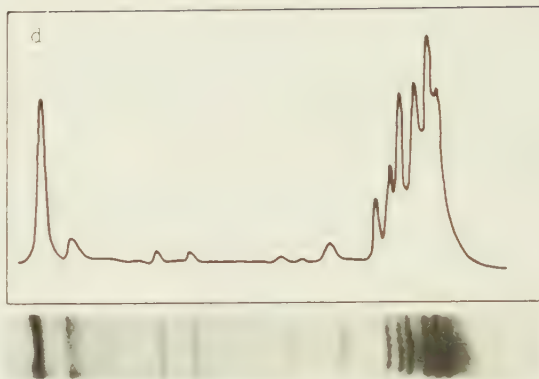


IEF-Muster : 4

PAGE-Muster: D III

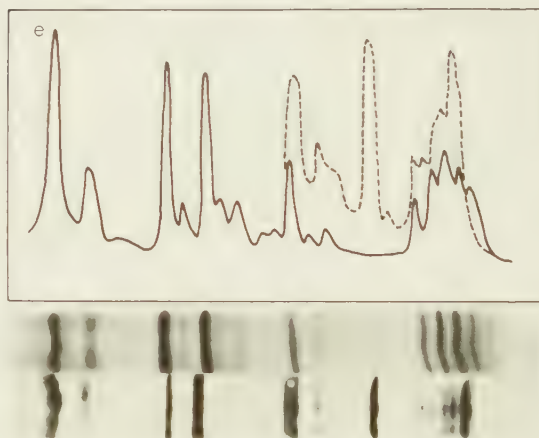
Genotyp : B^d/B^d Vorkommen :

rid, Kreuzung 11



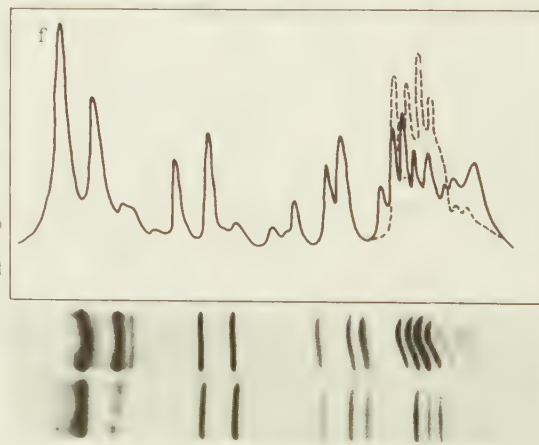
IEF-Muster : 5

PAGE-Muster: D II

Genotyp : B^a/B^C B^C/B^a Vorkommen :Kreuzung 7, 8: B^C/B^a Kreuzung 12 : B^a/B^C 

IEF-Muster : 6

PAGE-Muster: D IV

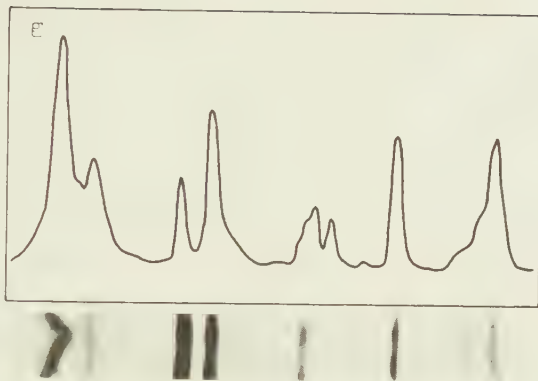
Genotyp : B^b/B^d B^d/B^b Vorkommen :Kreuzung 2 : B^d/B^b Kreuzung 11, 6: B^b/B^d 

IEF-Muster : 7

PAGE-Muster: D IV

Genotyp : B^b/B^c Vorkommen :

Kreuzungen 10, 12

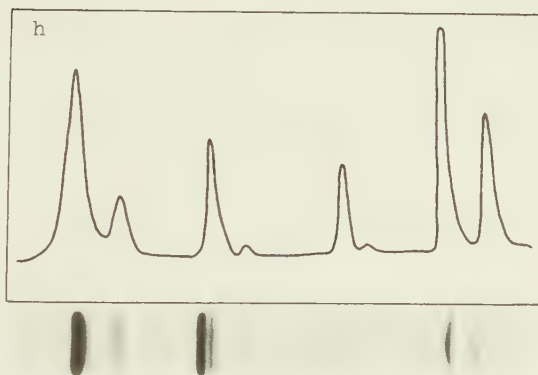


IEF-Muster : 8

PAGE-Muster: D II

Genotyp : B^a/B^d Vorkommen :

Kreuzung 11

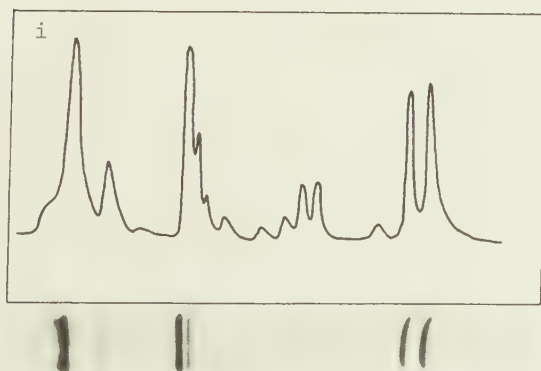


IEF-Muster : 9

PAGE-Muster: D VI

Genotyp : B^a/B^b
 B^b/B^a Vorkommen :

Kreuzungen 9, 10



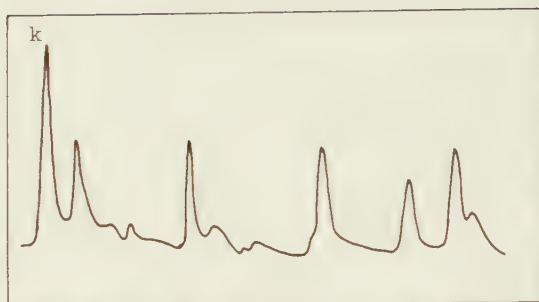
IEF-Muster : 10

PAGE-Muster: D III

Genotyp : B^C/B^d
 B^d/B^C

Vorkommen :

Kreuzungen 2,3



3. Untersuchung der freien Aminosäuren

Zur Untersuchung gelangten Kaulquappen der Kreuzungen 5, 6, 11 und 12, eine weitere Letalkreuzung als Kontrolle, sowie das den Kaulquappen verabreichte Futter. Die Nummern der Kreuzungen entsprechen denjenigen in Kapitel 2: Polymorphismus der Isozyme der Lactatdehydrogenase (siehe Tab. 5).

Da die Kaulquappen in verschiedenen physiologischen Altern untersucht wurden und die letalen Kaulquappen auch immer viel kleiner waren als die vitalen, wurde auf eine Gegenüberstellung der absoluten Werte in nMol / Aminosäure und Tier verzichtet. Der relative Anteil jeder einzelnen Aminosäure in % gestattet jedoch einen Vergleich auch zwischen nicht gleich grossen Tieren.

In Tab. 7 sind die prozentualen Anteile der einzelnen Aminosäuren in Ganztieren der verschiedenen Kreuzungen dargestellt. Auffallend ist der grosse Anteil von Serin bei letalen Tieren. Alle andern Aminosäuren liegen bei letalen Kaulquappen in ähnlichen Konzentrationen vor wie bei vitalen oder Durchbrennern.

Die prozentuale Verteilung der freien Aminosäuren in Restkörpern, das heisst Tieren, aus welchen der Darm entfernt wurde, ist für die grosse Mehrheit der untersuchten Aminosäuren nicht wesentlich abweichend von den Werten für Ganztiere. Lysin jedoch kommt in letalen Kaulquappen-Restkörpern in auffallend hoher Konzentration vor (Tab. 7 b). Durchbrennerkreuzungen unterscheiden sich in Bezug auf den Lysingehalt im Restkörper nicht von vitalen Kontrollen.

Sowohl im Futter, als auch in den untersuchten Darminhalten von vitalen Kontrollen findet man eine hohe Konzentration von Lysin (Tab. 7 c und d)

Bei letalen Kaulquappen erscheint in Chromatogrammen von Ganztieren zwischen der β - und γ -Aminobuttersäure eine unbekannte Ninhydrin-positive Komponente, die sich ausschliesslich auf letale Ganztiere beschränkt (Abb. 12). Gemäss Mischchromatographie mit bekannten Substanzen handelt es sich um das Kreatin. Auf die stoffwechselphysiolo-

gische Bedeutung dieses Befundes werden wir in der Diskussion noch zurückkommen (S. 81).

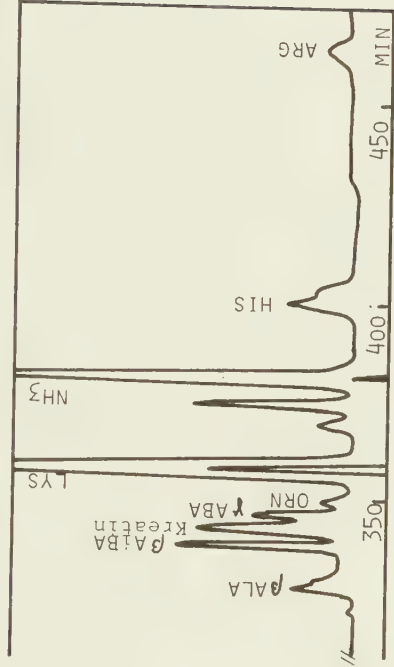
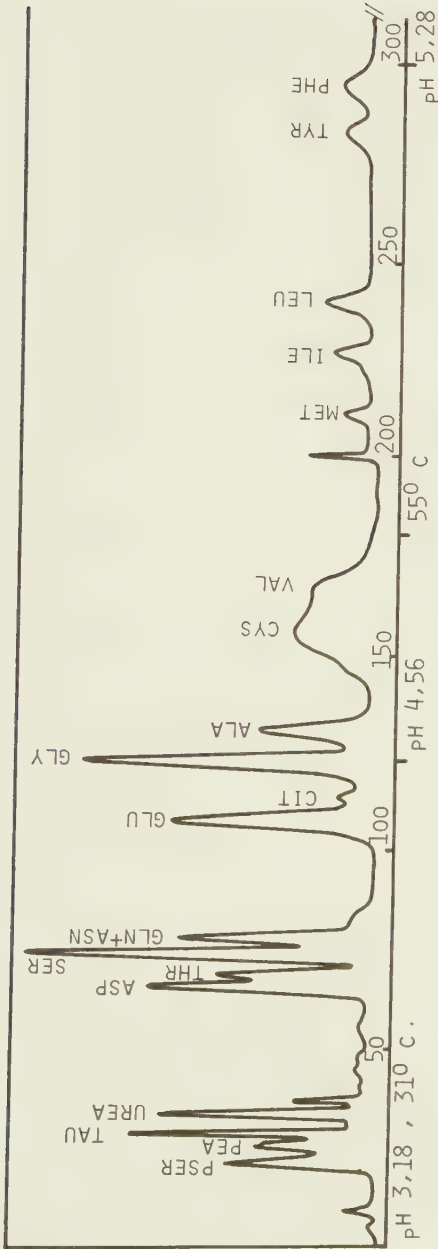


Abbildung 12: Chromatogramm von letalen Ganztieren der Kreuzung 5 (Säulenchromatographie mittels Aminosäureanalysator Multichrom B).

Tab. 7: Gehalt an Aminosäuren in % der Totalkonzentration

AS	a: Ganztier Kreuzung *				b: Restkörper Kreuzung				c: Darm	d: Futter
	5**	6	11	12	5	6		12	inh.	
PSER	2,6	0,8	2,4	1,0	2,0	1,2		0,8	3,1	1,1
PEA	6,6	2,4	4,9	4,7	5,6	2,0		2,6	4,9	0,7
TAU	5,5	2,6	3,5	5,0	3,6	1,5		3,1	0,2	0,6
ASP	7,7	10,2	5,2	12,8	4,2			5,8	3,3	2,7
THR	4,3	1,4	0,8		2,8	3,2		0,4	2,4	3,7
SER	12,7	3,6	2,5	3,5	8,0	2,8		4,0	6,5	6,5
GLN	2,4	5,3	3,0	6,5	4,2	4,7		5,2	1,9	10,7
ASN										
PRO	0,1		1,0			0,1		1,0		6,5
GLU	11,3	16,4	12,6	8,5	1,8	2,6		19,2	2,7	1,0
GLY	10,1	4,5	7,7	6,7	6,6	8,0		5,2	14,8	2,7
ALA	4,9	5,0	8,3	6,5	8,3	9,6		5,0	9,7	15,8
CYS		5,4	11,6	8,6		11,8		10,6		13,0
VAL		6,6	8,8	9,2		16,6		10,6		
MET	1,6	0,8	1,4	1,7		1,9		1,1	9,7	
ILE	1,5	2,4	2,1	2,4		4,0		1,3	3,9	3,2
LEU	2,2	2,8	3,1	3,5		8,0		3,0	3,0	4,6
TYR	1,8	1,0	1,1	1,1	3,4	6,0		1,6		1,7
PHE	2,1	1,0		1,5	2,4	2,3		2,5		2,4
β -AlBA	2,8	3,1	5,5			2,0		0,8		
γ -ABA	1,8	3,1	3,8			0,1		1,7		
ORN	0,5	0,5				2,0		1,6		
LYS	12,9	12,5	8,5	5,0	43,5	3,6		3,7	30,4	23,1
HIS	3,6	4,2	2,4	9,5	2,6	4,2		8,3	2,5	
ARG	1,2	3,2		2,2	1,2	1,6		1,1	0,1	

* Kreuzung 5, letal; 6, Durchbrenner; 11 und 12, vital.

** Das Chromatogramm für die Berechnung der vorliegenden Kreuzung ist in Abb. 12 dargestellt.

4. Immunologie

Zur Bestimmung des sich im Verlaufe der Immunisierung der Kaninchen aufbauenden Antikörpertiters wurde der Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (1967) angewendet. Abb. 13 zeigt zwei Beispiele, in denen der Titer des in der 2-dimensionalen Immunelektrophorese angewendeten Antiserums getestet wurde. Versuchsanordnung und Konzentrationen sind aus Abb. 13 ersichtlich. Obwohl bei allen Antikörperkonzentrationen mehrere Präzipitatlinien sichtbar sind, erwies sich die Verdünnungsrelation von $1/32 : 1/2$ zwischen Antigen und Antikörper als optimal. Dies bedeutet, dass die produzierten Antiseren immunologisch betrachtet 16 mal weniger konzentriert sind als das in diesem Test verwendete Serum aus adulten Fröschen.

Der Ouchterlony- Doppeldiffusionstest wurde nicht für qualitative Analysen verwendet, da für solche in der 2-dimensionalen Immunelektrophorese ein weitaus sensitiveres Mittel zur Verfügung stand. Mit dieser Methode konnten im Serum von Kaulquappen maximal 10 antigenisch aktive Proteine festgestellt werden. Die hier dargestellten Resultate beschränken sich auf die Kreuzungen 5, 6, 11 und 12 (siehe Kapitel III. 2. Tab. 5) Da die letale Kreuzung 5 nicht in genügender Menge zur Verfügung stand, wurde das immunologische Verhalten von letalen Kaulquappen zusätzlich an der Kreuzung 4 getestet.

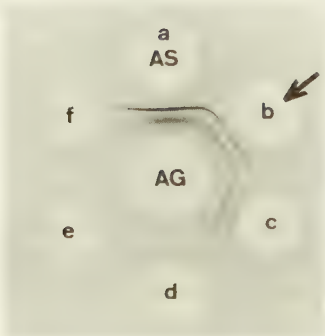
Von den Kreuzungen 6, 11 und 12 konnte Serum in genügender Menge gewonnen werden, während die Kreuzungen 4 und 5 in einem Entwicklungsstadium starben, in dem es noch nicht möglich war, genügend Blut zu erhalten. Deshalb wurde in diesen Fällen Totalhomogenat von Kaulquappen untersucht.

Bei der Auswertung dieser Gele interessierten wir uns vor allem für die qualitativen Unterschiede zwischen letalen und vitalen Kaulquappen.

In den untersuchten 5 Kreuzungen sind in der F_1 nur die Phänotypen esculenta oder ridibunda zu erwarten. Deshalb beschränkten wir uns bei der Auswertung auf diejenigen

Abbildung 13: Ouchterlony- Doppeldiffusionstest zur Erfassung des Antikörpertiters: a) AG = Antigen aus ridibunda, Antiserum (AS) = anti-ridibunda. b) AG aus lessonae gegen AS gegen lessonae. Das optimale Konzentrationsverhältnis ist mit einem Pfeil markiert.

a)



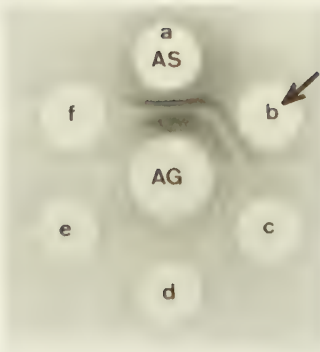
Antiserumkonzentrationen:

a : 1
 b : 1/2
 c : 1/4
 d : 1/8
 e : 1/16
 f : 1/32

Antigenkonzentrationen:

In beiden Tests : 1/32

b)



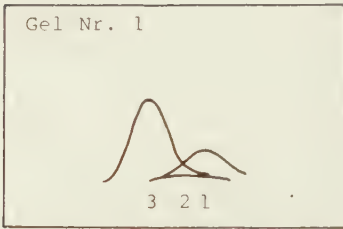
Gele, welche das Antiserum gegen ridibunda enthalten.

4.1. Immunologische Unterschiede in Totalhomogenaten

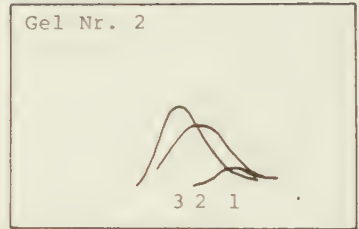
Die Präzipitation von immunologisch aktiven Serumproteinen aus Totalhomogenaten von Kaulquappen bringt eine sehr starke Verdünnung der Proteine mit sich. Deshalb konnten in den entsprechenden Gelen nur maximal drei aktive Proteine gefunden werden. Immerhin sind aus Abb. 14 einige Unterschiede zwischen den einzelnen Kreuzungen ersichtlich: In Kreuzung 11 (ExR) erscheinen drei Präzipitate (No. 1, 2 und 3), wobei das Protein des Präzipitates No. 2 am schwächsten, dasjenige von No. 3 am stärksten konzentriert ist. Protein No. 1 liegt in mittlerer Konzentration vor. Kreuzungen dieser Elternkombination bringen in der F_1 den Phänotyp ridibunda hervor. Die Kreuzung 12 (ExL) jedoch ergibt in der F_1 der Phänotyp esculenta. Im Vergleich mit Kreuzung 11 sind folgende Unterschiede festzustellen: Das Protein 2 ist hier wesentlich konzentrierter vorhanden als das Protein 1. Die Mobilität der einzelnen Proteine in der ersten Dimension der Elektrophorese ist bei Kreuzung 12 reduziert. Es ergeben sich also sowohl quantitative als auch qualitative Unterschiede zwischen Kreuzung 11 und 12. Die Durchbrennerkreuzung 6 verhält sich sehr ähnlich wie Kreuzung 11. Die zwei sehr schwachen aktiven Komponenten der Kreuzung 5 entsprechen wahrscheinlich den Komponenten 1 und 3 der Kreuzung 11.

4.2 Immunologische Unterschiede im Serum von Kaulquappen

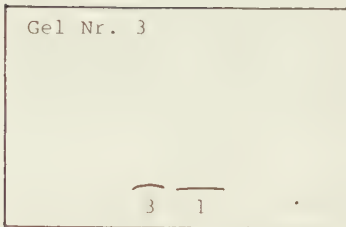
Da bei der Untersuchung von Serum die antigenischen Proteine in viel höherer Konzentration vorliegen als in Totalhomogenaten, erscheinen hier auch weniger konzentrierte Proteine. Ein rein optischer Vergleich zwischen den einzelnen Kreuzungen ist hier nicht mehr möglich, da in diesen Gelen bis zu 10 Präzipitate erscheinen. Die Laufweiten der einzelnen Fraktionen wurden deshalb graphisch erfasst, so dass die Vergleichsmöglichkeit verbessert wurde.



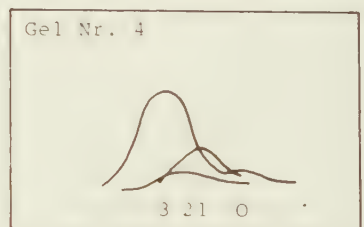
Kreuzung 11: ExR



Kreuzung 12: ExL



Kreuzung 5: ExE letal



Kreuzung 6: ExE Durchbrenner

Abbildung 14: 2-dimensionale Immunelektrophorese von Totalhomogenaten aus Kaulquappen. Es wurden Antisera gegen ridibunda gebraucht.

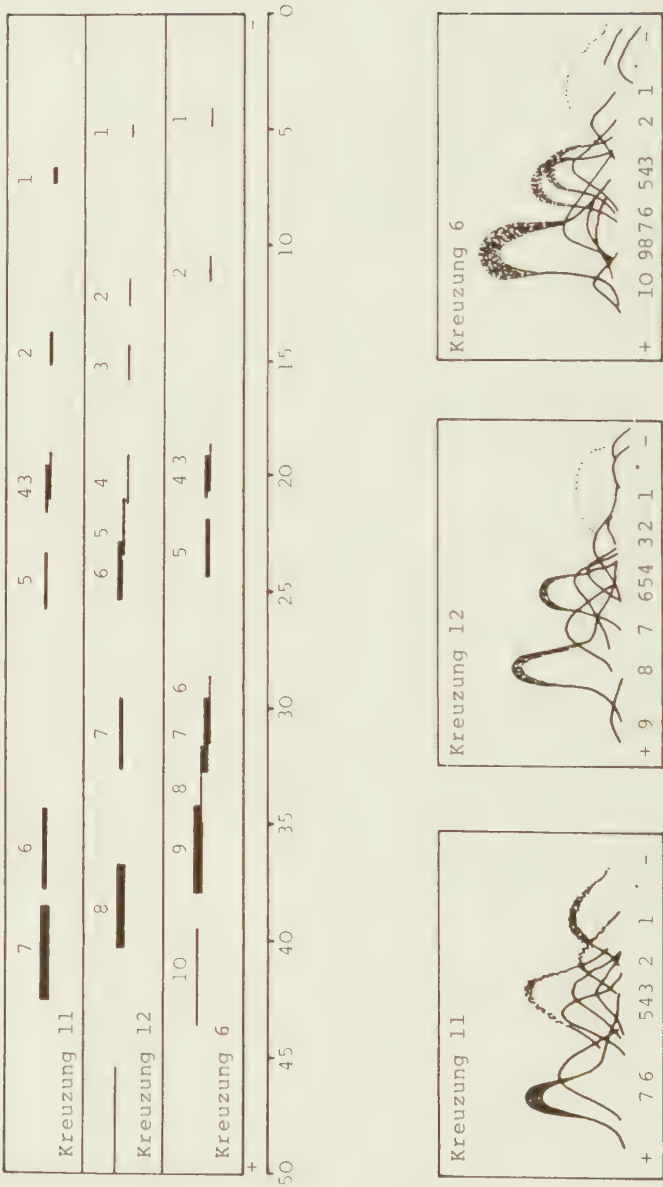
In Abb. 15 sind die Resultate der 3 Kreuzungen 6, 11 und 12 zusammengefasst. Dabei wurde zur effektiven Laufweite jeder Fraktion ein Streuungsbereich von $\pm 10\%$ eingezeichnet. Die Präzipitate wurden von der Kathode zur Anode durchnummeriert (siehe auch Abb. 16).

Wiederum interessierten wir uns für die verwandtschaftliche Stellung der Kreuzung 6 zu den Kreuzungen 11 und 12. Dabei fallen folgende Unterschiede auf: Die in Kreuzung 11 auftretenden Fraktionen 6 und 7 kommen auch bei Kreuzung 6 als Fraktion 9 und 10 vor. Die Fraktion 8 von Kreuzung 12 weist eine andere Mobilität auf als die eben erwähnten Fraktionen. Die Fraktionen 7 der Kreuzungen 12 und 6 erscheinen identisch. In Kreuzung 6 treten in diesem Bereich die Fraktionen 6 und 8 hinzu. Der Bereich der Fraktionen 3, 4 und 5 lässt sich in Kreuzung 11 und 6 homologisieren, während bei Kreuzung 12 zusätzlich die Fraktion 5 eingeschaltet ist, dafür aber keine homologen Proteine zu den Fraktionen 3 in Kreuzung 11 und 6 gefunden werden können.

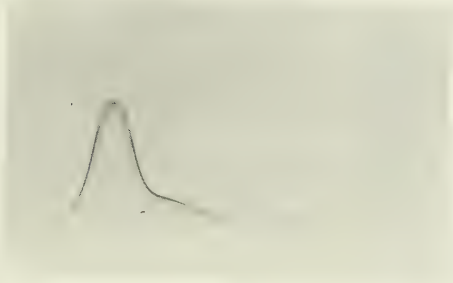
Die Uebereinstimmung zwischen den Kreuzungen 11 und 6 ist aufgrund der erwähnten Unterschiede auch hier grösser als zwischen den Kreuzungen 12 und 6.

Die Seren der Kreuzungen 6, 11 und 12 wurden auch gegen lessonae-spezifisches Antiserum getestet. Dabei fällt die geringere Anzahl an Präzipitaten auf. Die in Abb. 17 dargestellten Gele unterscheiden sich in allen Kreuzungen von denjenigen Mustern, welche mit anti-ridibunda-Antiserum erhalten wurden (Abb. 16).

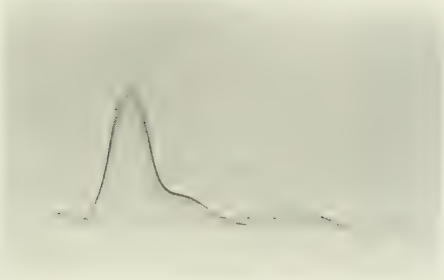
Abbildung 15: 2-dimensionale Immunelektrophorese von Serum aus Kaulquappen der Kreuzungen 6, 11 und 12, gegen anti-ridibunda-Serum getestet.



Kreuzung 11: ExR



Kreuzung 12: ExL



Kreuzung 6: ExE

Durchbrenner



Abbildung 16: 2-dimensionale Immunelektrophorese
von Serum aus Kaulquappen der Kreuzungen 6,
11 und 12, gegen anti- ridibunda- Antiserum
getestet.

Kreuzung 11: ExR



Kreuzung 12: ExL



Kreuzung 6: ExE
Durchbrenner



Abbildung 17: 2-dimensionale Immunelektrophorese von Seren aus Kaulquappen der Kreuzungen 6, 11 und 12 gegen anti- lessanae- Antiserum getestet.

5. Ermittlung des Ploidiegrades durch Erythrozytenmessung

Folgende Elterntiere wurden auf ihren Ploidiegrad untersucht:

Kreuzung*	Weibchen	Männchen
5	+	+
6	+	+
11	+	+
12	+	+
1	+	-
7	-	+
8	+	-
4	-	+
ExE _C	+	-

*Die Nummern der Kreuzungen entsprechen den im Kapitel III.2., Tab. 5 aufgeführten Zahlen. "+" bedeutet das Geschlecht, das untersucht wurde. Ueberdies wurden neben den Elterntieren die Kaulquappen der Kreuzungen 6, 11 und 12 untersucht.

Die durchschnittlichen Erythrozytendurchmesser sind in Tab. 8 zusammengestellt.

Die durchschnittliche Erythrozytengrösse für esculenta liegt zwischen 25,02 µm und 27,17 µm. Eine Gruppierung der Werte in zwei Grösseklassen, welche eine Unterscheidung zwischen diploiden und triploiden Tieren zulassen würde, ist aus den erhaltenen Werten nicht ableitbar.

Die Werte für ridibunda sind auffallend tief, diejenigen für lessonae auffallend hoch. Die Extremwertbereiche für ridibunda und lessonae überschneiden sich nicht, weshalb der Erythrozytendurchmesser als arttypisches Merkmal diskutiert werden muss. Der Extremwertbereich für esculenta liegt zwischen den Bereichen für ridibunda und lessonae und überschneidet sich mit diesen. Solche Korrelationen wurden in morphologischen Untersuchungen des esculenta-

Komplexes oft gefunden (Berger 1973).

Die Erwartung, dass sich die Kreuzungen 5 und 6 in Bezug auf die Ploidie unterscheiden, erfüllte sich nicht. Die beiden esculenta- Männchen der Kreuzungen 5 und 6 unterscheiden sich nicht in Bezug auf die Erythrozytengrösse und das Weibchen war für beide Kreuzungen dasselbe.

Die Werte für die Kreuzungen 6, 11 und 12 liegen in den erwarteten Bereichen. Die Kreuzungen 6 und 11 sind aufgrund des Kreuzungsschemas dem Genotyp ridibunda, die Kreuzung 12 dem Genotyp esculenta zuzuordnen.

Eine graphische Auswertung der Daten zeigt Abb. 18.

Tab. 8 : Erythrozytendurchmesser von Elterntieren und Kaulquappen aus verschiedenen Kreuzungen.

Phänotyp / Kreuzungstyp	Kreuzung No.	♀	♂	n	Durch- messer x in μm	s
esc	5,6,11,12	+		50	26,38	1,56
esc	5		+	50	25,28	1,40
esc	6		+	50	25,48	1,96
rid	11		+	50	23,89	1,15
esc	12		+	50	27,01	1,58
esc	1	+		50	25,02	1,60
les	7		+	50	28,99	1,60
les	8	+		50	28,76	1,56
esc	4		+	50	27,17	1,58
esc	ExE _C	+		50	26,22	1,64
ExE	6		F ₁	50	23,60	0,98
ExR	11		F ₁	50	23,36	0,57
ExL	12		F ₁	50	24,34	0,98

Extremwertbereiche

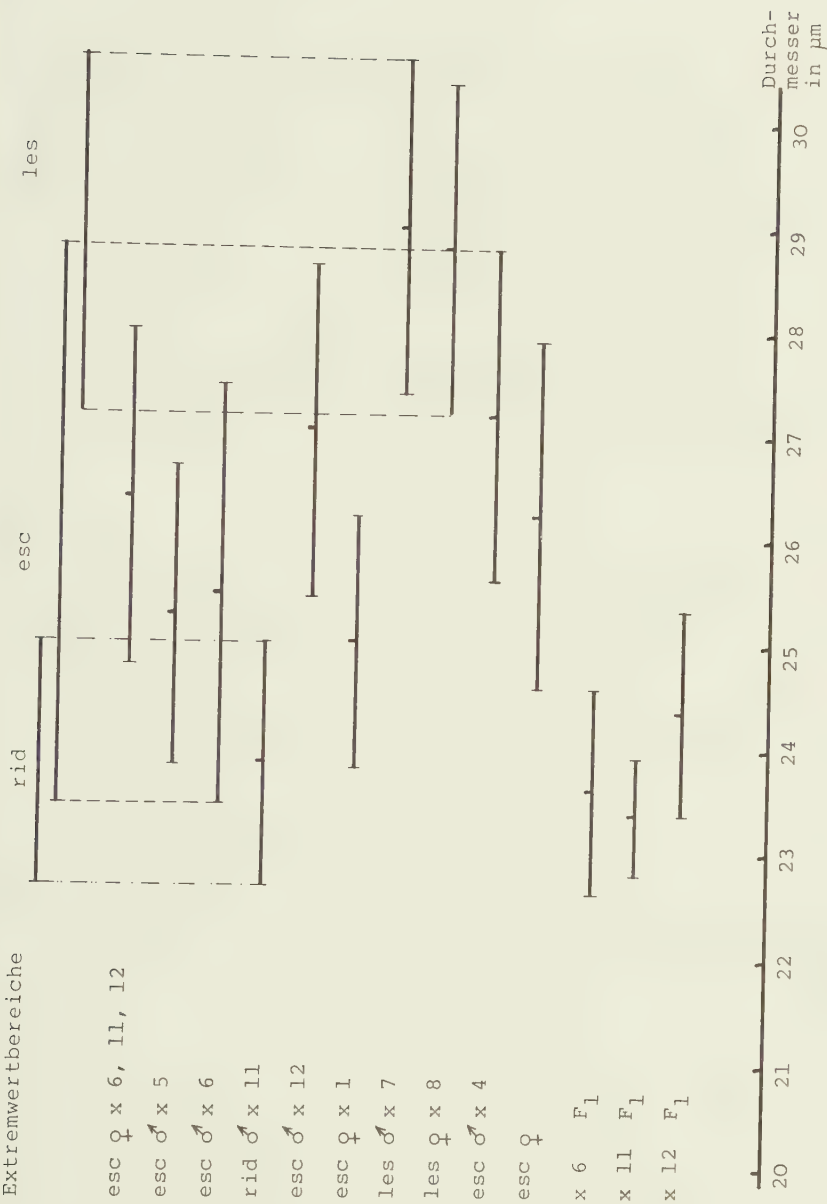


Abb. 18: Graphische Darstellung der Erythrozytendurchmesser. Erklärungen im Text

6. Gewichtszunahme und Entwicklungsgeschwindigkeit

Abb. 19 zeigt die Gewichtszunahme von vitalen, letalen und Durchbrennerkaulquappen. Die Gewichtszunahme der letalen Tiere verläuft vom Fütterungsbeginn weg beinahe linear, während bei Durchbrennern der Anstieg der Kurve verzögert erfolgt. Die Steigung der Kurve ist bei Durchbrennern flacher als bei vitalen Tieren. Letale Kreuzungen zeigen nach Fütterungsbeginn keinen Anstieg der Gewichtskurve.

Entwicklungsgeschwindigkeit und Wachstum der letalen und der Durchbrenner-Kreuzungen werden im Kapitel über die Parabiose eingehender diskutiert.

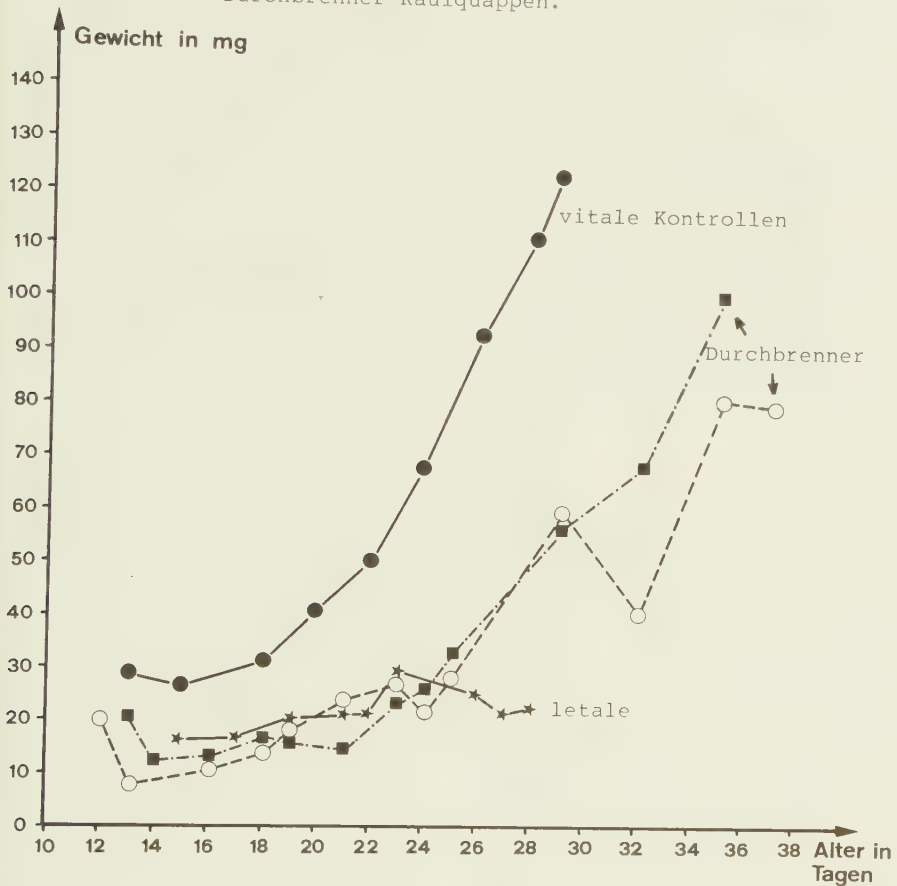
7. Thyroxinversuch

Wie bereits im Kapitel Material und Methoden erwähnt, sollte mit diesem Versuch die Reaktionsbereitschaft vitaler und letaler Kaulquappen auf das Hormon Thyroxin überprüft werden. Die Auswahl der zu behandelnden Kreuzungen erfolgte aufgrund der Phänotypen der Eltern, da im Zeitpunkt des Versuchsbeginnes noch nicht festgestellt werden kann, ob eine Kreuzung des Typs ExE tatsächlich zu letalen Tieren führt oder zu Durchbrennern.

Die Kaulquappen der ausgewählten, erwartungsgemässen Letalkreuzung, zeigten keine Letalitätskrise und metamorphosierten zum Teil. Somit handelt es sich um eine der wenigen Durchbrennerkreuzungen. Trotz dieses unerwarteten Versuchsablaufes werden die Resultate hier zusammengestellt, da sie einige entwicklungsphysiologische Aspekte, welche bisher nicht untersucht wurden, beleuchten.

Die zwei im Versuch verglichenen Kreuzungen wiesen bei Behandlungsbeginn dasselbe absolute Alter von 32 Tagen auf. Der physiologische Entwicklungszustand zeigte in diesem Zeitpunkt einen deutlichen Vorsprung der vitalen Kaulquappen gegenüber den Durchbrennern. Dieser Vorsprung äussert sich in der Gewichts Differenz einerseits und im

Abbildung 19: Gewichtszunahme von vitalen, letalen und Durchbrenner-Kaulquappen.



Stand der Metamorphose anderseits. Während die vitalen Kaulquappen bereits Hinterbeinknospen von 1 mm Länge aufwiesen, waren bei der Durchbrennerkreuzung erst die durchschimmernden Anlagen der Hintérextrémitäten zu sehen.

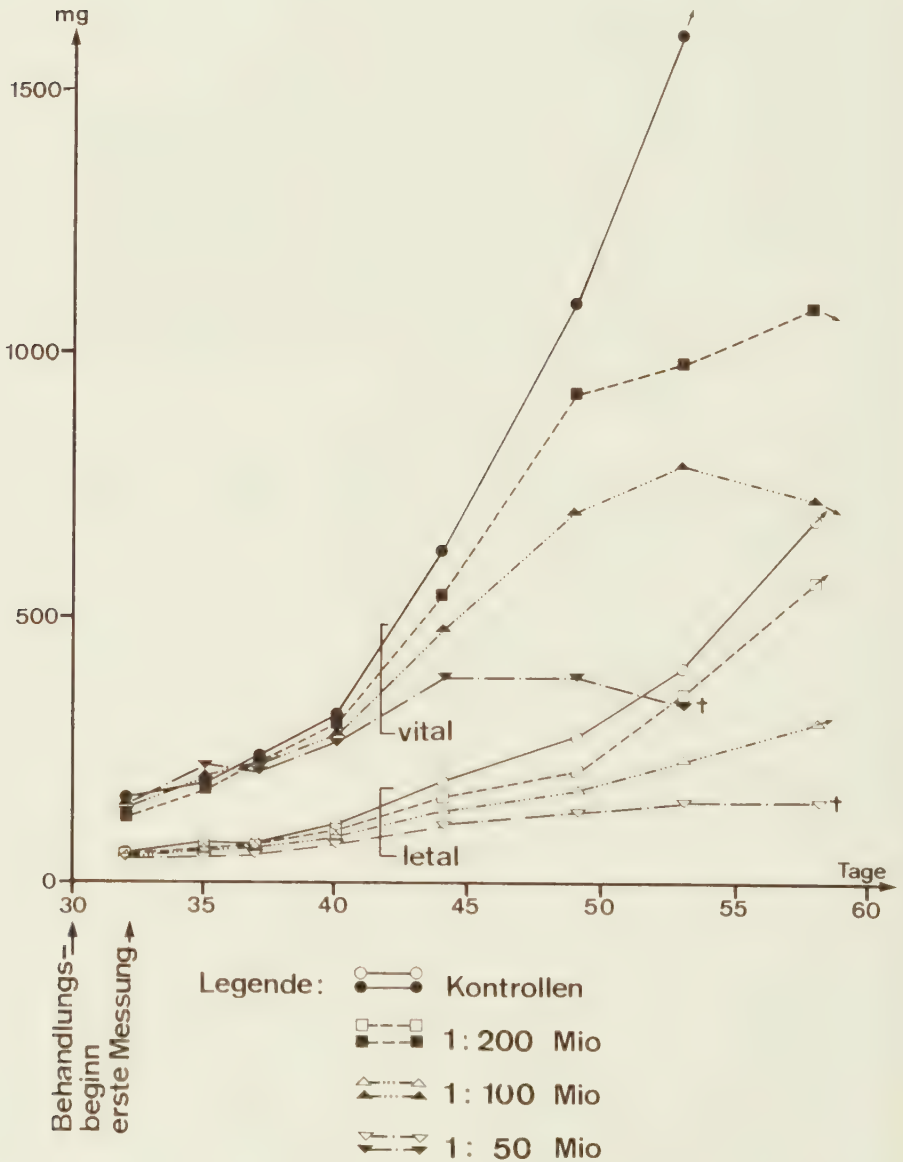
Als Mass für die Geschwindigkeit der Metamorphose kann das Wachstum der Hinterbeine und der Durchbruch der vorderen Extremitäten herangezogen werden. Diese Daten sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Die Durchbrenner reagieren sehr viel langsamer als die vitalen Kaulquappen auf das Thyroxin. Dies ist aus der stagnierenden Gewichtszunahme ersichtlich, welche auch als Zeichen der einsetzenden Metamorphose angesehen werden kann. Die Gewichtszunahme der einzelnen Versuchsklassen ist in Abb. 20 dargestellt.

Tab. 9 : Anzeichen der Thyroxinbeschleunigten Metamorphose zweier Kreuzungen gemessen an der Länge der Hinterextremität und dem Durchbruch der Vorderextremität.

Kreuzung	Merkmal	Thyroxin- konzentra- tion	Tage ab Laichdatum		
			50	55	60
vitale Kontrollen	Länge der Hinterex- tremität in mm	1 : ∞	1	5	10
		1 : 200 Mio	3	10	15
		1 : 100 Mio	5	14	18
		1 : 50 Mio	9	16	18
	Durchbruch der Vorder- extremität	1 : ∞	-	-	-
		1 : 200 Mio	-	-	-
		1 : 100 Mio	-	-	+
		1 : 50 Mio	-	+	+
Durch- brenner	Länge der Hinterex- tremität in mm	1 : ∞	-	-	-
		1 : 200 Mio	1	3	5
		1 : 100 Mio	1	4	5
		1 : 50 Mio	1	3,5	6
	Durchbruch der Vorder- extremität	1 : ∞	-	-	-
		1 : 200 Mio	-	-	-
		1 : 100 Mio	-	-	-
		1 : 50 Mio	-	-	+

Abbildung 20: Gewichtszunahme unter Thyroxineinwirkung



8. Histologie

Die Parabiose bietet eine sehr gute Vergleichsmöglichkeit zwischen vitalen Kontrollen und einem letalen Partner auch in histologischer Hinsicht. Abb. 21 zeigt einen Querschnitt durch eine Parabiose der Serie J, in welcher ein Partner der Durchbrennerkreuzung ExE_{A2} , der andere der Letalkreuzung ExE_{A3} angehörte (siehe Tab. 2). Die Parabiose wurde im Alter von 19 Tagen fixiert, als der letale Partner noch lebte, aber klare morphologische Zeichen des Todes zeigte. In Bezug auf die Entwicklungsgeschwindigkeit der beiden Partner liegen hier nicht so starke Unterschiede vor wie in Serien mit einem vitalen und einem letalen Partner, was die Vergleichsmöglichkeit noch verbessert. Abb. 23 zeigt die Parabiose zwei Tage vor deren Fixierung. Vom Schwanzende des rechten Partners her beginnt der Zerfall des Gewebes. Dieser äussert sich zunächst in einer Krümmung und im Zerfall des Flossensaumes. Wenn jeweils diese Symptome auftraten, konnte auch bei letalen Kontrolltieren mit dem Tode innerhalb der nächsten Woche gerechnet werden.

In den Abb. 21, 23 und 24 fällt auf, dass die Muskulatur des vitalen Partners (Durchbrenners) keine abnormitäten aufweist, wogegen der letale Partner durch einen unregelmässigen Aufbau der Muskulatur auffällt, was auf die Degeneration derselben schliessen lässt. Dasselbe gilt auch für die Chorda, welche beim letalen Partner ein stark pathologisches Bild zeigt. Diese degenerativen Prozesse sind kein Präparationsartefakt, da sie auf der ganzen Länge des Präparates auftreten.

Diese histologischen Befunde werden in Kapitel IV. 4. diskutiert.

Abbildung 21: Querschnitt durch eine Parabiose der Serie J, Klasse Ia (Tab.2). Links Durchbrenner, rechts letale Larve.



Abbildung 22: Parabiose der Serie J. Partner rechts = ExE_{A3} ,
(Letalkreuzung), Partner links = ExE_{A2} ,
(Durchbrennerkreuzung). Weitere Erklärungen
im Text.

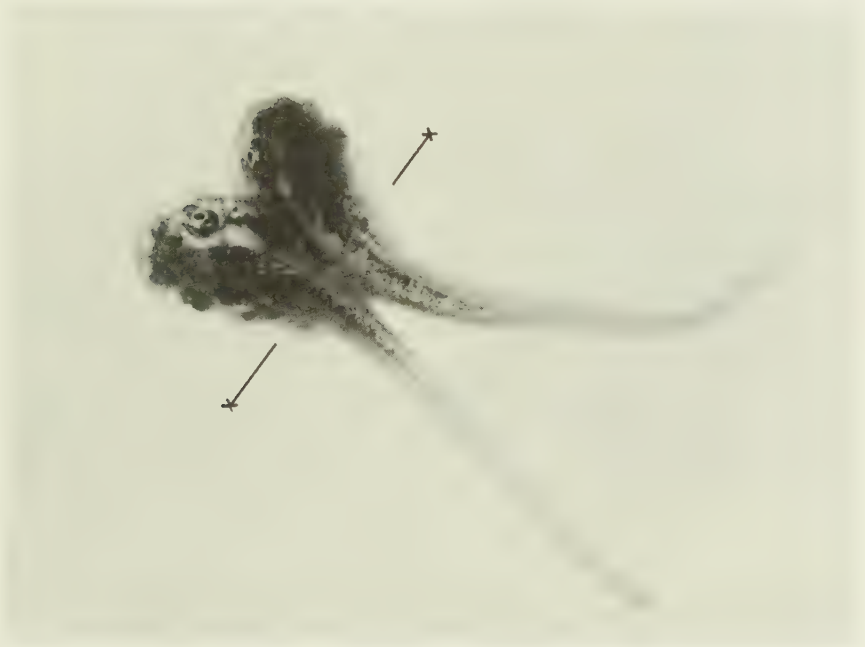


Abbildung 23: Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 21: Querschnitt durch Myotome (M), Chorda (C), Neuralrohr (N) des vitalen Partners.

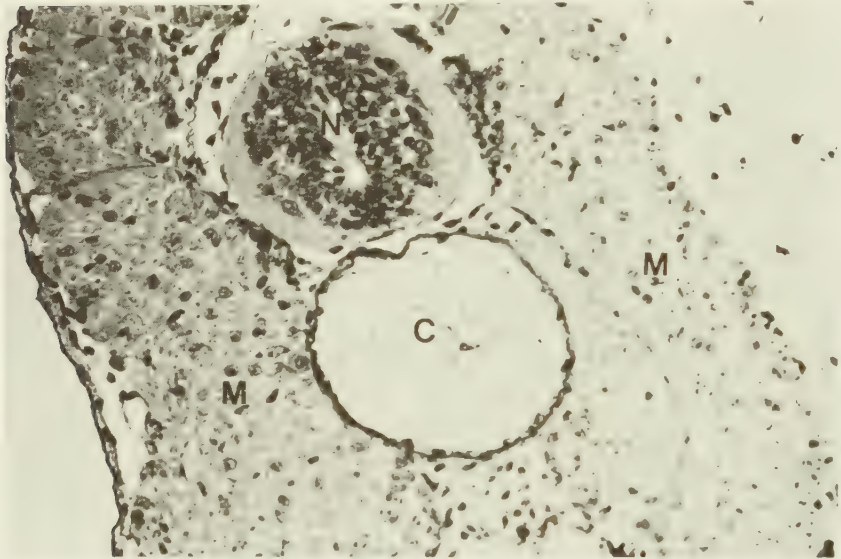
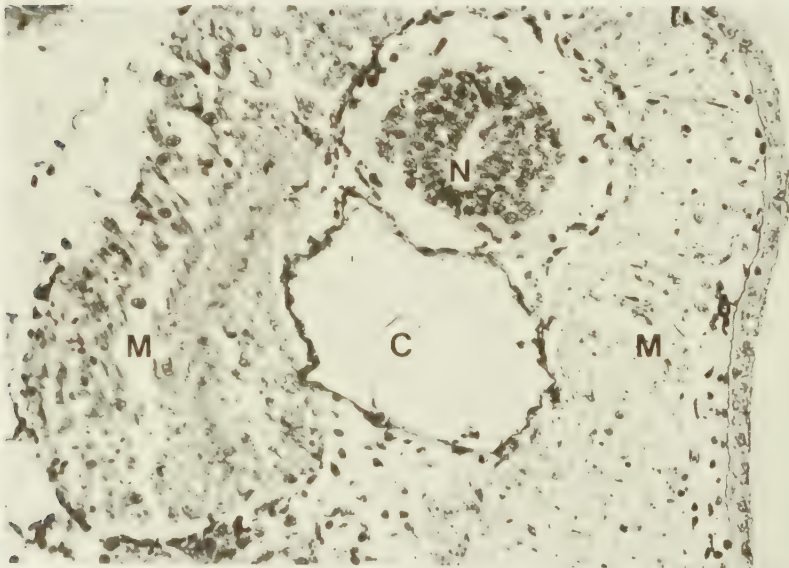


Abbildung 24: Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 21: Querschnitt durch Myotome (M), Chorda (C) und Neuralrohr des letalen Partners.



IV. DISKUSSION

1. Vergleich der Froschpopulationen verschiedenartiger Biotope

Die Biotope, aus welchen die Elterntiere bezogen wurden, unterscheiden sich in verschiedenen Belangen voneinander. Die Unterschiede in Bezug auf das Entstehungsalter sind in Kapitel I. 1., Zuchtmethoden erwähnt. Die Biotope A, B und C sind in diesem Jahrhundert entstanden. Dies geht einerseits aus der geologischen Beschaffenheit des umgebenden Geländes hervor, anderseits bestätigten Nachfragen bei den Besitzern, dass die Ausbeutung der Kiesgruben (A und C) in die erste Hälfte dieses Jahrhunderts fällt. Woher diese Biotope besiedelt wurden, kann nur durch weitere Nachforschungen rekonstruiert werden. Im Falle des Waldweiher D lässt sich aufgrund der geologischen Gegebenheiten mit grosser Wahrscheinlichkeit sagen, dass die Entstehung dieses Weiher im Gegensatz zu A, B und C nicht in dieses Jahrhundert fällt, sondern in die Epoche nach der Würm-Eiszeit (Hug 1905). Geologisch betrachtet ergeben sich demnach wesentliche Unterschiede zwischen A, B und C einerseits und D anderseits. Es war sehr interessant zu sehen, wie die Populationen diesen geologischen, das heisst altersbezogenen Korrelationen folgen, indem der Unterschied zwischen Biotop C und D ebenfalls am auffälligsten ist (Tab. 1).

Nicht nur das Verhältnis zwischen den gefangenen Rana esculenta zu Rana lessonae (in C: 98 : 21 ; in D 47 : 91) ist sehr unterschiedlich, sondern auch das ausschliessliche Vorkommen von Durchbrennerkreuzungen aus den Biotopen A und C, wobei aus A nur eine, aus C jedoch 3 solche Kreuzungen hervorgingen. Zu übereinstimmenden Resultaten kamen Blankenhorn, Heusser und Notter (1973) was Biotop A betrifft: Sie fanden ein stark zugunsten von Rana esculenta verschobenes Verhältnis (Rana esculenta : Rana lessonae = 517 : 12). Aus unserer eigenen Statistik ergibt sich ein analoges Ver-

hältnis von 55 : 3. Blankenhorn, Heusser und Notter (1973) fanden zwar 18 % überlebende Tiere aus einer Laichprobe von 79 Kaulquappen nach 68 Tagen. Ob diese 18 % allerdings aus einer Kreuzung von Rana esculenta x Rana esculenta hervorgingen und somit Durchbrenner wären, lässt sich nicht feststellen, da die Phänotypen der Eltern dieser Laichprobe nicht bekannt sind.

Berger (1971) findet, dass in der F_1 von 51 Paaren des Phänotyps Rana esculenta die Vitalität stark erniedrigt ist. Die F_1 aus 20 Kreuzungen starb während der Entwicklung, während aus der F_1 von 9 weiteren Kreuzungen nur wenige Tiere metamorphosierten. Der Laich von weiteren 20 Kreuzungen soll sehr viel vitaler gewesen sein und viele Kaulquappen metamorphosierten. Dies bedeutet, dass Berger in seinen Kreuzungen eine feine Abstufung der Letalität beobachten konnte von Kreuzungen, in welchen alle Kaulquappen das Stadium 25 nicht erreichten bis zu solchen, in denen sich die Mehrzahl der Kaulquappen über die Metamorphose hinaus entwickelten.

Unsere Resultate stehen im Gegensatz dazu, insofern als dass jeweils alle Kaulquappen einer Kreuzung überlebten oder restlos starben. Eine Variabilität gab es in unseren Kreuzungen nur in Bezug auf die Ueberlebensdauer.

Die vorliegenden Zahlen (Fangstatistik und Ueberlebensdauer der einzelnen Kreuzungen) lassen keine Schlüsse zu in Bezug auf die Ausbreitungsmechanismen und die Phylogenese der Grünfrösche in unserer Region, jedoch zeigen sie, dass es offenbar wesentliche Unterschiede gibt in den Populationsstrukturen verschiedenaltiger Biotope. Alte Populationen scheinen ausgeglichener zu sein in Bezug auf die Phänotypverteilung und auch in Bezug auf die Anteile von Weibchen und Männchen innerhalb der verschiedenen Phänotypen.

2. Die Entwicklung des letalen Partners in Parabiose

Bei der Durchführung der Parabioseexperimente gab es erhebliche Probleme zu überwinden. Die Beschaffung von mehreren Kreuzungen aus verschiedenen Biotopen zu mehr oder weniger demselben Zeitpunkt war sehr problematisch, da wir bewusst auf die Verwendung von künstlich angesetzten Kreuzungen verzichteten. Wir waren auf die natürliche Paarung der unter Laborbedingungen gehaltenen Elterntieren angewiesen. Während der Saison, in welcher dieser Versuch geplant war, kopulierten nur 16 % der gesammelten, adulten Frösche erfolgreich, was bedingte, dass sehr viele Frösche gesammelt werden mussten. Der Unterbringung von adulten Fröschen waren jedoch klare räumliche Grenzen gesetzt. Zudem laichen die Grünfrösche über eine Zeitspanne von zwei bis drei Wochen, wobei der Zeitpunkt unter anderem abhängig ist von der Wassertemperatur. Aufgrund der unterschiedlichen Exposition zur Sonne ergeben sich für die verschiedenen Biotope unterschiedliche Laichzeiten. Trotz diesen erschwerenden Umständen gelang es, 7 verschiedene synchronisierte Kreuzungen zu erhalten.

Aufgrund des morphologischen und anatomischen Verhaltens, zusammen mit der Erfassung der Lebensdauer der einzelnen Parabioseserien, sollten folgende Fragen abgeklärt werden:

1. Manifestieren sich die morphologischen Anzeichen der Letalität auch dann, wenn ein letaler Partner mit einem vitalen kombiniert wird ?

2. Welche Folgen hat die Parabioseoperation an und für sich bei vitalen Partnern ? (Kontrolle)

3. Wie wirkt sich die Partnerschaft mit einer vitalen Kaulquappe in Bezug auf die Ueberlebensdauer einer letalen aus ?

4. Gibt es Unterschiede in der Entwicklung von Parabiosen mit einem vitalen Partner des Kreuzungstyps ExL zu Parabiosen mit einem Partner des Kreuzungstyps LxL, wenn diese mit denselben letalen Partnern kombiniert werden ?

Die erste Frage kann eindeutig positiv beantwortet werden. In Abb. 25 ist eine Parabiose aus der Serie M dargestellt, in welcher der vitale Partner LxL_D mit einem letalen Partner aus Biotop A kombiniert wurde. Der linke Partner zeigt eindeutig die Symptome der Letalität: Die linke Kaulquappe ist eindeutig kleiner und in der Entwicklung im Rückstand. Der Rumpfbereich wirkt aufgedunsen und die Muskulatur im Schwanzbereich ist stark missbildet, so dass sie ihre Funktion nicht mehr ausüben kann. Trotzdem eine stoffliche Austauschmöglichkeit zwischen den beiden Partnern besteht, können diese morphologischen und anatomischen Defekte nicht korrigiert werden durch den vitalen Partner. Dies bedeutet, dass die genetisch bedingte letale Auswirkung sich autonom manifestiert.

Die zweite Frage ist viel schwieriger zu beantworten. Die Folgen der Operation an und für sich sind von der Genauigkeit der Operationstechnik abhängig. Je tiefer die Wunde bei den beiden Partnern gesetzt wird, umso mehr besteht die Möglichkeit von unlösbaren Schwierigkeiten in der Anlage des Darmes. So wurde bei manchen Parabiosen entweder überhaupt kein Anus angelegt oder aber nur von einem Partner, während der Darm des anderen Partners blind in der Bauchhöhle endete. Ein solcher Ileus-artiger Zustand müsste zum raschen Tode eines Individuums führen. Aus diesem Grunde wurden Parabiosen ohne Kot separat behandelt. Es ist auffallend, dass gerade die Parabiosen von zwei letalen Partnern, welche von der betroffenen Missbildung betroffen waren, erstaunlich lang überlebten. In drei Fällen (Serie A, J und K in Tab. 2) lebten solche Kombinate sogar länger als Parabiosen mit normalem Magen-Darm-Trakt. Dass die Verdauung bei letalen Kaulquappen gestört ist, konnte auch aufgrund des Kotes festgestellt werden: Während vitale Kaulquappen die charakteristischen Kotstränge entlassen, sieht man in Zuchtbecken mit letalen Kaulquappen nichts dergleichen. Die Nahrungsverwertung in letalen Tieren ist wahrscheinlich stark gestört, wie dies auch die Untersuchungen

Abbildung 25: Parabiose der Serie M: $\text{ExE}_{\text{A3}} + \text{LxL}_{\text{D2}}$.
Alter 14 Tage. Weitere Erklärungen im Text.



über die freien Aminosäuren zeigen. Ernährungsphysiologische Differenzen werden später im Kapitel über die Aminosäureanalyse diskutiert.

Die Frage nach der Ueberlebensdauer einer letalen Kaulquappe in Parabiose mit einer vitalen lässt sich wie folgt beantworten: Wie aus Abb. 2, 3 und 4 ersichtlich ist, überleben mit einer Ausnahme (Serie D) alle Parabiosen zwischen vitalen und letalen Partnern die mittlere Lebensdauer der jeweiligen letalen, einzeln gehaltenen Kontrollen (Serien E, N, P, F, G, O) um 16 - 18 % (siehe Tab. 3). Dies lässt den Schluss zu, dass der vitale Partner via gemeinsame oder kommunizierende Blutbahn einen positiven Einfluss ausübt. Diese Einflussnahme manifestiert sich nicht oder nur un deutlich in Parabiosen, deren letaler Partner aus Biotop C stammt. Dies ist begreiflich, denn gerade die Letalkreuzungen aus diesem Teich zeichnen sich durch eine, verglichen mit Biotop D, relativ lange Lebensdauer aus. Da aber dem Leben einer Parabiose an und für sich schon Grenzen gesetzt sind, (Serie C, Kontrolle), manifestiert sich die positive Einflussnahme der vitalen Partner negativ (Serie D) oder nur sehr schwach (Serie F).

Die vierte Frage lässt sich auch eindeutig beantworten aufgrund der in Abb. 2, 3 und 4 zusammengestellten Ergebnisse und aufgrund der statistischen Auswertung. Ein "homozygoter" Partner des Typs LxL vermag einen letalen Partner signifikant besser, das heisst lebensverlängernd zu beeinflussen als ein "heterozygoter" Partner des Typs ExL. Aufgrund der bisherigen Kenntnis über die Vererbung innerhalb des Rana esculenta- Komplexes muss angenommen werden, dass Rana esculenta aus der Hybridisierung zwischen Rana ridibunda und Rana lessonae hervorgegangen ist. Da jedoch in den untersuchten Biotopen ein lessonae-esculenta-System vorliegt, findet keine Neueinführung von ridibunda-typischem genetischem Material statt. Der Zeitpunkt der Hybridogenese ist für unser Untersuchungsgebiet noch nicht bekannt, dürfte aber im letzten Postglazial zu suchen sein. Seit jener Zeit

vererbte sich das ridibunda-Genom nur durch den heterozygoten Hybriden esculenta. Da sich in dieser langen Zeitspanne keine intermediären Phänotypen zwischen Rana lessonae und Rana esculenta ausgebildet haben, ist anzunehmen, dass nur in sehr beschränktem Ausmass Rekombination zwischen den arttypischen Chromosomensätzen von lessonae und ridibunda stattgefunden hat. Damit könnten sich im Verlaufe der letzten Jahrhunderte auf dem ridibunda-Genom Letalfaktoren angesammelt haben, welche sich auf das heterozygote Genom von esculenta belastend auswirken. Dies ist jedoch nicht der Fall bei homozygoten Tieren des Genotyps LxL. Allerdings liegt bis jetzt keine genaue genetische Information über die in dieser Arbeit untersuchten Grünfroschtypen vor.

3. Die B-Untereinheiten der LDH-Isozyme in der F₁-Generation

Nach Tunner (1973) und Vogel (1977) werden die Gene, die die LDH-Untereinheiten B^a und B^c codieren, nicht an die Nachkommen von Kreuzungen mit einem Elternteil des Phänotyps esculenta weitergegeben. Diese Hypothese wird unterstützt durch Graf (1979), welcher in gynogenetisch erzeugten Kaulquappen die lessonae-typischen Isozyme nie feststellen konnte, obwohl sie im Soma des Weibchens vorhanden sind.

In einem der vier untersuchten Biotope (C) wird diese, in der Hybridogenese auch andernorts anzutreffende Regel (Schultz 1969) durchbrochen. Die Nachkommen der Kreuzungen 2, 3, 11 und 12 (Tab. 5) zeigen wider Erwarten die lessonae-typische Untereinheit B^c.

Die Kreuzungen 5, 6, 11 und 12 wurden künstlich ange-
setzt, womit Eier von demselben Genotyp mit Spermien von
verschiedener Herkunft und Genotyp besamt wurden.

Die Kreuzungen 1, 4, 5, 9 und 10 verhalten sich erwartungsgemäss, wenn angenommen wird, dass die Untereinheiten B^a und B^c von Eltern des Phänotyps esculenta nicht weitergegeben werden. Widersprüche zu dieser Hypothese

gibt es aber in den Kreuzungen 2, 3, 11 und 12. Die Kaulquappen dieser Kreuzungen enthalten die Untereinheiten B^a oder B^c , womit die allgemeine Gültigkeit der obigen Hypothese widerlegt ist.

In der Nachkommenschaft der Kreuzungen 2 und 3 kann die Untereinheit B^c nur von der väterlichen Seite stammen. Dies sind innerhalb der überprüften 12 Kreuzungen gleich zwei Fälle, in denen nachgewiesen werden kann, dass auch die Spermatogenese von esculenta der Eliminationshypothese nicht unbedingt folgen muss. Die betreffenden Männchen stammen aus Biotop C, welches sich wie bereits erwähnt durch eine zu gunsten von esculenta verschobene Population auszeichnet. Das Weibchen, welches für die Kreuzungen 5, 6, 11 und 12 verwendet wurde, kann offensichtlich verschiedene Gameten ausbilden. In der Kreuzung 5, welche letal war, findet man die Untereinheit B^a in der F_1 nicht mehr. In der F_1 der Kreuzungen 11 und 12 kann jedoch die Untereinheit B^a nur aus dem mütterlichen Genom stammen, da dieses Allel bei den Vätern nicht vorhanden ist.

In Kreuzung 6 überlebten die Kaulquappen und ihr Genotyp ist deshalb besonders interessant. Vergleichen wir die Kreuzungen 5 und 6, so wird eindeutig klar, dass nicht nur das Genom der Mutter für Letalität oder Vitalität einer F_1 verantwortlich ist.

Es ist nicht einfach, ein System zu finden, wonach aus dem Genotyp der Eltern und der F_1 ableitbar ist, ob es sich bei einer bestimmten Kreuzung um eine letale oder eine vitale handelt. Aus Tab. 5 geht hervor, dass der Genotyp der Nachkommen von Kreuzung 6 (B^b/B^d) zu Durchbrennern führt, während der reziproke Genotyp B^d/B^b in Kreuzung 2 zu einer letalen F_1 führt.

Vogel (1977) fand in 8 untersuchten Kreuzungen des Typs esculenta x esculenta eine Kreuzung, welche zu einer zur Metamorphose befähigten F_1 führte. Diese Nachkommen hatten wie im vorliegenden Fall den Genotyp B^b/B^d . Dies könnte zum Schluss verleiten, dass dieser Genotyp allgemein zu vitalen Nachkommen führt. Dies wird aber widerlegt durch die

letale Kreuzung 2, in welcher die F_1 ebenfalls diesen Genotyp aufweist. Allerdings stammt hier das Allel B^d von der Mutter, während es bei den zwei zitierten Kreuzungen vom Vater stammt. Wird die Herkunft der Untereinheiten B^b und B^d mit in Betracht gezogen, so könnte man den Schluss ziehen, dass der Genotyp B^b/B^d nur zu vitalen Nachkommen führt, wenn das Allel B^d vom Vater stammt. Für Weibchen des Phänotyps esculenta bedeutet dies, dass sie die Genotypen B^a/B^b oder B^b/B^c haben müssten, um überhaupt vitale Nachkommen erzeugen zu können.

Der Genotyp B^b/B^c wurde in der F_1 nie gefunden, obwohl er bei Eltern beiderlei Geschlechts vorkommt. Nachkommen einer Kreuzung des Typs $B^b/B^c \times B^c/B^d$ konnten nicht untersucht werden, weil eine solche Paarung nicht zustande kam.

Falls die Feststellung, dass nur Weibchen der Genotypen B^a/B^b oder B^b/B^c eine vitale F_1 erzeugen können, zutrifft, hätten in den in Tab. 5 zusammengefassten Kreuzungen drei esculenta-Weibchen die Chance gehabt, vitale Nachkommen zu produzieren. In den zwei Fällen (Kreuzungen 1 und 5), in denen die Nachkommen trotzdem letal waren, hatten die Männchen den Genotyp B^b/B^c , während das Männchen der Durchbrennerkreuzung 6 den Genotyp B^c/B^d aufwies.

Bei der Analyse der IEF-Densitogramme stellte sich heraus, dass die Herkunft eines Allels für dessen Expressivität eine Rolle spielt. Es wurden sowohl für das IEF-Muster 5 als auch 6 je zwei Variationstypen gefunden, welche sich je nach Anordnung der Allele in zwei verschiedenen Mustern ausdrücken (siehe Abb. 11 e und f). Die Richtigkeit dieses Befundes wird unterstützt durch den Umstand, dass für die IEF-Muster 7 bis 10 (Abb. 11 g -k), bei welchen reziproke Genotypen theoretisch möglich wären, immer nur einheitliche Muster gefunden wurden. Dies muss aufgrund der analysierten F_1 - Genotypen auch erwartet werden.

4. Die freien Aminosäuren in vitalen und letalen Kaulquappen

Es sind im wesentlichen zwei Aminosäuren, Serin und Lysin, welche sehr auffallende Unterschiede zwischen letalen und vitalen Kaulquappen zeigen. Vor allem sticht der hohe Gehalt von Lysin in den Restkörpern von letalen Kreuzungen ins Auge. Die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren stehen normalerweise unter Kontrolle, denn sie sind bei gleichbleibenden stoffwechselphysiologischen Bedingungen recht konstant (Chen 1970). Normale Zellen gleicher Art ergeben bei der Analyse immer den gleichen Gehalt an den einzelnen Aminosäuren, der sich aber unter gewissen starken Belastungen (z.B. Stress - Situationen) verändern kann (Florey 1970).

Letale Kaulquappen zeigen unter anderem stark aufgedunsene Rumpfe. Sie wirken glasig-transparent aufgrund von unter der Haut angesammeltem Wasser. Diese Feststellung führte uns zur Annahme, dass die osmotischen Verhältnisse in letalen Tieren gestört sein könnten. Durch die Untersuchung der freien Aminosäuren, welche bei wasserlebenden Organismen teilweise an osmotischen Vorgängen teilnehmen, ergeben sich Erklärungsmöglichkeiten für das beschriebene Phänomen. Das Lysin ist die im aus Luzernemehl und Brenneselpulver bestehenden Futter prozentual häufigste Aminosäure (Tab. 7). Bei einer blockierten Proteinsynthese wird diese Aminosäure speziell in den Zellen angehäuft. Eine gestörte Proteinsynthese ist für letale Kaulquappen durchaus denkbar, da diese ein stark verlangsamtes Wachstum verbunden mit einer sehr geringen Gewichtszunahme zeigen.

Die Verhältnisse für die untersuchten Ganztiere sind nicht so auffallend wie diejenigen für Restkörper. Obwohl auch hier einige Aminosäuren (PEA, THR, SER, GLY) bei letalen Tieren gehäuft vorkommen, sind die Unterschiede zwischen vitalen und letalen Kaulquappen hier wesentlich geringer. Dies könnte daran liegen, dass der Darminhalt, welcher gezwungenermassen mitextrahiert wurde, zu einer Verfälschung der Resultate führt. Aus diesem Grunde werden

diese Zahlen (Tab. 7 a) nicht weiter berücksichtigt.

Eine sehr interessante Beobachtung jedoch stellt der exklusiv bei letalen Ganztieren vorkommende Peak zwischen den Aminosäuren β -Aminoisobuttersäure und der γ -Aminobuttersäure dar. Aufgrund von Vergleichschromatogrammen handelt es sich bei dieser ninhydrinpositiven Substanz mit grosser Wahrscheinlichkeit um Kreatin (siehe Chromatogramm in Abb. 12).

Das Kreatin kommt unter normalen Umständen in der Muskulatur als Kreatinphosphat vor und steht in enger Beziehung zum Energiewechsel der Muskelkontraktion (Leuthard 1963). Da bei letalen Kaulquappen gravierende Veränderungen der Muskulatur beobachtet wurden (siehe Kapitel II. 8.), muss angenommen werden, dass auch hier der Kreatinstoffwechsel erheblich gestört ist. Für eine lückenlose Abklärung der oben geschilderten stoffwechselphysiologischen Störungen bei den letalen Larven sind weitere Untersuchungen über den intermediären Metabolismus der einzelnen Aminosäuren unentbehrlich.

5. Immunologische Hinweise auf die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen *Rana esculenta* und *Rana ridibunda*

Die Stellung der Kreuzungen vom Typ esculenta x esculenta war für uns von zentralem Interesse. Die Gele No. 3 und 4 in Abb. 14 geben wichtige Hinweise auf die immunologisch erfassbaren verwandtschaftlichen Beziehungen: In Gel No. 3 handelt es sich um eine letale Kreuzung, wobei die untersuchten Tiere noch sehr klein waren und somit nur sehr wenig Serumprotein enthielten (Kreuzung 5). In Gel No. 4 konnten jedoch Kaulquappen aus einer Durchbrennerkreuzung (Kreuzung 6) verarbeitet werden und der Vergleich mit den Kreuzungen 11 und 12 zeigt eine wesentlich grössere Ähnlichkeit zwischen Gel No. 1 und 4 als zwischen No. 2 und 4.

Dies bedeutet, dass Letalkreuzungen des Typs ExE immunologisch dem Phänotyp ridibunda näher stehen als dem Phänotyp esculenta. Gleichzeitig ist aber auch zu bemerken, dass

zwischen Gel No. 1 und 4 keine Identität besteht. Daraus kann abgeleitet werden, dass nicht ganze lessonae- oder ridibunda-typische Chromosomensätze vererbt werden, sondern dass Rekombination derselben in Kreuzungen des Typs esculenta x esculenta in beschränktem Ausmass möglich ist. Gerade das Auftreten von Durchbrennern unterstützt diesen Befund.

Die Seren der Kreuzungen 6, 11 und 12 wurden auch gegen lessonae-spezifisches Antiserum getestet. Dabei fällt die geringe Anzahl an Präzipitaten auf (siehe Abb. 17). Die erhaltenen Muster unterscheiden sich bei allen Kreuzungen von denjenigen, welche mit anti-ridibunda-Serum hergestellt wurden. Dies ist ein Indiz, dass einerseits in allen untersuchten Kreuzungen lessonae-spezifische Proteine vorhanden sind; dass es sich tatsächlich um artspezifische Proteine handelt, ist aus den z.T. abweichenden R_f -Werten ersichtlich. Andererseits spricht das qualitativ einheitliche Muster dafür, dass diese Proteine in allen Kreuzungen konservativ vorkommen und weitergegeben werden.

6. Zum Problem der Triploidie im *Rana esculenta*-Komplex

In zahlreichen Arbeiten wird das Auftreten von triploiden Individuen von *Rana esculenta* erwähnt. (Uzzell, Berger und Günther 1975, Halfmann und Müller 1972, Berger 1979). Triploidie und gestörte Meioseverhältnisse, welche eine gestörte Fertilität der Weibchen und Männchen nach sich ziehen, werden oft beschrieben (Günther 1975). Die Störung des Meioseablaufes äussert sich in Aneuploidien, Polyploidien, Chromosomenbrüchen und - Fragmenten. Auch unstabile Paarungen, heterologe Multivalente und Asynchronität im Erreichen bestimmter Teilungsstadien durch die Chromosomen einer Zelle werden beschrieben. Allerdings wird in derselben Arbeit (Günther 1975) einschränkend ausgesagt, dass die obigen Feststellungen nur für bestimmte Populationen zutreffen und dass sogar innerhalb derselben Population

wesentliche Unterschiede in Bezug auf die Fertilität von Individuum zu Individuum feststellbar sind.

Der Mittelwert der Erythrozytendurchmesser von triploiden Tieren liegt aufgrund der oben zitierten Arbeiten bei 30 μm , wogegen diploide Tiere ($2n = 26$) einen Erythrozytendurchmesser von 23,5 μm aufweisen. Unsere Untersuchungen ergaben Werte zwischen 23,36 μm und 28,99 μm , wobei die grössten Werte bei adulten Tieren des Phänotyps Rana lessonae gemessen wurden. Bei diesem Phänotyp wurden aber nie abnormale Ploidieverhältnisse gefunden. Alle Männchen und Weibchen, welche für künstliche Befruchtungen seziert wurden, wiesen nie atrophierte Hoden oder unterentwickelte Ovarien auf. Die Spermien, welche jeweils auf ihre Aktivität geprüft wurden, zeigten nie eine reduzierte Aktivität. Dies bedeutet, dass in den von uns untersuchten Populationen keine gravierenden Fertilitätsprobleme auftreten, welche sich durch abnormen Ploidiegrad zeigen würden. Aufgrund der Erythrozytendurchmesser muss angenommen werden, dass keine triploiden Elterntiere für die untersuchten Kreuzungen verwendet wurden.

Auch die Nachkommen aus den Kreuzungen 6, 11 und 12, welche durch künstliche Befruchtung zustande kamen, zeigten in keinem Fall Erythrozyten, die auf Triploidie schliessen lassen.

Sehr auffallend ist jedoch die Grössenverteilung in Bezug auf die drei Phänotypen: Während Rana ridibunda die kleinsten Erythrozyten aufweist, sind diejenigen von Rana lessonae am grössten. Der Grössenbereich von Rana esculenta liegt intermediär und überschneidet sich mit den Werten für ridibunda und lessonae.

Was unser Untersuchungsgebiet betrifft muss das Problem der Letalität auf einer anderen Basis diskutiert werden, da wir bisher keine triploiden Individuen festgestellt haben.

7. Exogene Beeinflussung der Kaulquappen durch Thyroxin

Wie in Kapitel III. 7. dargestellt wurde, reagieren die Kaulquappen der Durchbrennerkreuzungen sehr viel langsamer auf die Thyroxinbehandlung als die vitalen Kontrollen. Während bei Kontrollen nach 60 Tagen in der Konzentration 1 : 100 Millionen bereits der Durchbruch der Vorderextremitäten erfolgt, wird bei Durchbrennern zu demselben Zeitpunkt die Metamorphose erst eingeleitet, was sich durch das Wachstum der Hinterextremitäten äussert. Erst die unphysiologische Konzentration von 1 : 50 Millionen erbrachte bei Durchbrennerlarven die vollständige Metamorphose, wirkte sich aber letal auf die Kaulquappen aus (Tab. 9 und Abb. 20).

Der Parabioseversuch zeigte, dass sich Durchbrennerkreuzungen im Vergleich mit vitalen Kontrollen klar differenziert verhalten. Der vorliegende Thyroxinversuch bestätigt diese Resultate und belegt im weiteren, dass Durchbrennerkreuzungen nicht als voll vitale Kreuzungen betrachtet werden können. Die Reaktionsbereitschaft der Amphibienlarven auf die Thyroxinwirkung ist ein sehr kompliziertes Phänomen, welches nur bei normalem Ablauf des Entwicklungsgeschehens erreicht werden kann (siehe Weber 1967, Frieden 1968).

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Grünfrösche der Phänotypen Rana esculenta und Rana lessonae wurden aus vier verschiedenen Biotopen gesammelt und für die Kreuzungsexperimente verwendet. Die Froschpopulationen dieser Biotope unterscheiden sich sowohl im Verhältnis der beiden Phänotypen als auch im Geschlechterverhältnis innerhalb eines Phänotyps.
2. Eingehende Analyse der F_1 - Generation bei der inter se-Kreuzung von Rana esculenta ergab neben den letalen Nachkommen auch vitale Durchbrenner. Innerhalb einer Kreuzung sind aber alle Individuen entweder letal oder vital. Die Variabilität ist sehr wahrscheinlich von der Populationsstruktur der Elterntiere abhängig.
3. Die Parabiose eines letalen Partners mit einem vitalen beweist, dass die genetisch bedingte Letalität sich autonom manifestiert. Die Lebensdauer der letalen Larve kann jedoch durch den vitalen Partner um 16 - 18 % verlängert werden.
4. Untersuchungen über die Isozyme der Lactatdehydrogenase mittels isoelektrischer Fokussierung zeigen, dass die lessonae-spezifischen Allele, welche die Untereinheiten B^a und B^c codieren, an die Nachkommen weitergegeben werden. Dies deutet darauf hin, dass eine Totalelimination des lessonae- Genoms bei der Gametogenese von Rana esculenta nicht in jedem Fall stattfindet.
5. Immunologisch stehen die Nachkommen der letalen oder vitalen inter se- Kreuzungen von Rana esculenta dem Phänotyp ridibunda näher als dem Phänotyp lessonae oder esculenta. Aufgrund eingehender Analyse der immunologisch aktiven Proteine muss angenommen werden, dass Rekombination zwischen lessonae- und ridibunda-Chromosomen möglich ist.

6. Messungen der Erythrozytengrösse deuten darauf hin, dass triploide Individuen bei den von uns durchgeführten Kreuzungsversuchen nicht vorkommen.
7. Die Reaktionsbereitschaft auf Thyroxin ist bei den Larven der inter se- Kreuzung von Rana esculenta stark reduziert. Ihr Muster der freien, ninhydrinpositiven Substanzen zeichnet sich durch die Akkumulation von gewissen Aminosäuren und Derivaten, wie Lysin und Kreatin, aus. Die stoffwechselphysiologischen Störungen, die zur Letalität führen könnten, werden diskutiert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Berger, L. (1964). Is Rana esculenta lessonae Camerano a distinct species ? Ann. Zool. 22, 245-261.
- Berger, L. (1968). Morphology of the F₁ generation of various crosses within Rana esculenta complex. Acta Zool. Cracov 13, 301-324.
- Berger, L. (1970). Some characteristics of the crosses within Rana esculenta complex in postlarval development. Ann. Zool. Warszawa 27, 373-416.
- Berger, L. (1971). Sex ratio in the F₁ progeny within forms of Rana esculenta complex. Gen. Pol. 12, 87-101.
- Berger, L. (1973). Systematics and Hybridization in European Green Frogs of Rana esculenta Complex. J. of Herpetology 7, 1-10.
- Berger, L. (1979). Egg size as an index of phenotype in progeny of Rana esculenta females. Mitt. Zool. Mus. Berlin, 55, 187-202.
- Blankenhorn, H.J. (1973). Zum Stand der Forschung über die Verbreitung der Grünfrösche im Kanton Zürich. Rev. Suisse Zool. 80, 655-661.
- Blankenhorn, H.J., Heusser, H. und Notter, P. (1973). Zur Verbreitung von Rana esculenta Linnaeus und Rana lessonae Camerano im Zürcher Oberland. Rev. Suisse Zool. 80, 662-666.
- Bulletin 5. (1970) Separation News, Pharmacia Fine Chemicals.

- Chen, P. S. (1970). Amino-acids and derivatives in amphibian embryos. *Int. J. Biochem.* 1, 669-682.
- Chen, P. S. (1977). Analysis of Amino Acids, Peptides and related Compounds. In *Analytical Biochemistry of Insects*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York.
- Crowle, A.J. (1973). Immunodiffusion (second ed.) Academic press, Inc. New York.
- Davis, J. B. (1964). Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- Engelmann, W. E. (1972). Disk-Elektrophorese der Serumproteine von Wasserfröschen. *Acta biol. med. germ.* 29, 431-435.
- Engelmann, W. E. (1973). Zur Frage der verwandtschaftlichen Beziehungen europäischer Grünfrösche (Gattung *Rana*). *Zool. Jb. Syst.* 100, 183-196.
- Florey, E. (1970). Lehrbuch der Tierphysiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Frieden, E. (1968). Biochemistry of amphibian metamorphosis. In *Metamorphosis, a problem in developmental biology*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Günther, R. (1968). Morphologische und ökologische Untersuchungen zur Unterscheidung von *Rana esculenta* L. und *Rana ridibunda* Pall. *Zool. Jb. Syst.* 95, 229-265.
- Günther, R. (1975). Untersuchungen der Meiose bei Männchen von *Rana ridibunda* Pall., *Rana lessonae* Cam. und der Bastardform "*Rana esculenta*" L. Anura). *Biol. Zbl.* 94, 277-294.

- Gornall, A. G., Bardawill, C. J. und David, M. M. (1949).
Determination of serum proteins by means of the biuret
reaction. J. Biol. Chem. 177, 751-766.
- Graf, J. D. and Müller, W. P. (1979). Experimental gynogenesis
provides evidence of hybridogenetic reproduction in
the Rana esculenta complex. Experientia 35, 1574-1576.
- Halfmann, H. und Müller, P. (1972). Populationsuntersuchun-
gen an Grünfröschen im Saar-Mosel-Raum. Salamandra 8,
112-116.
- Hamburger, V. (1942). A Manual of Experimental Embryology.
The University of Chicago Press Chicago, Illinois, U.S.A.
- Hantke, R. (1967). Geologische Karte des Kantons Zürich und
seiner Nachbargebiete. Kommissionsverlag Leemann, Zürich.
- Hug, J. (1905). Die Drumlinlandschaft der Umgebung von Andel-
fingen (Kt. Zürich). Beiträge zur Geologie der Schweiz,
neue Serie Lifg. 15, Spezialkarte Nr. 34.
- Karaman, S. (1948). Prilog herpetologiji sjeverne Srbije.
Prirodosl. Istraz. Zagreb 24, 31-74.
- Kauri, H. (1959). Die Rassenbildung bei europäischen Rana-
Arten und die Gültigkeit der Klimaregeln. Ann. Soc.
Tart. Res. Nat. Invest. Const. Lund 2, 1-171.
- Leuthardt, F. (1963). Lehrbuch der Physiologischen Chemie.
Walter de Gruyter + Co, Berlin.
- Mertens, R. und Wermuth, H. (1960). Die Amphibien und Rep-
tilien Europas. Frankfurt a.M.

- Moser, H. (1950). Ein Beitrag zur Analyse der Thyroxinwirkung im Kaulquappenversuch und zur Frage nach dem Zustandekommen der Fröhberereitschaft des Metamorphose-Reaktionssystems. Rev. Suisse der Zool. 57, Fasc. suppl. Nr. 2, 1-144.
- Ouchterlony, Oe., (1967). In: Weir (Ed.) Handbook of experimental immunology. Academic Press, New York, San Francisco, London.
- Schultz, R. J. (1969). Hybridization, unisexuality and polyploidy in the teleost Poeciliopsis (Poeciliidae) and other vertebrates. Amer. Natur. 103, 605-609.
- Shumway, W. (1940). Stages in the normal development of Rana pipiens. The Anatomical Record, 78, 139-147.
- Tunner, H. G. (1970). Das Serumeiweissbild einheimischer Wasserfrösche und der Hybridcharakter von Rana esculenta. Verh. Dtsch. Zool. Ges., 352-358.
- Tunner, H. G. (1972). Serologische und morphologische Untersuchungen zur Frage der Artabgrenzung bei Wasserfröschen aus der Umgebung von Mainz (Rhein-Main-Gebiet). Z. zool. Syst. Evolut.-forsch. 10, 127-132.
- Tunner, H. G. (1973). Das Albumin und andere Bluteiweisse bei Rana ridibunda Pallas, Rana lessonae Camerano, Rana esculenta Linné und deren Hybriden. Z. zool. Syst. Evolut.-forsch. 11, 219-233.
- Uzzell, T., Berger, L. und Günther, R. (1975). Diploid and triploid progeny from a diploid female of Rana esculenta (Amphibia Salientia). Proc. Acad. Sci. Philad. 127, 81-91.

- Uzzell, T und Hotz, H.J. (1979) Electrophoretic and morphological evidence for two forms of green frogs (Rana esculenta - complex) in peninsular Italy (Amphibia, Salientia). Mitt. Zool. Mus. Berlin, 55, 13-27.
- Vesterberg, O. (1975) In: Isoelectric Focusing , Arbuthnott, J.P. and Beeley, J.A. eds. (Butterworths, London) 78-96.
- Vogel, P. (1973). Elektrophoretische Untersuchungen der Serumproteine von Grünfröschen aus dem Rana esculenta-Komplex. Diplomarbeit an der Universität Zürich.
- Vogel, P. (1977). Isozyme der Lactatdehydrogenase (LDH) im Rana esculenta - Komplex. Dissertation an der Universität Zürich.
- Vogel, P. und Chen, P. S. (1976). Genetic control of LDH-isozymes in the Rana esculenta complex. Experientia, 32, 304-307.
- Vogel, P. und Chen, P. S. (1977). A further study of LDH isozymes in the Rana esculenta complex. Experientia, 33, 1285-1287.
- Volpe, E. P. (1980). The Amphibian Embryo in Transplantation Immunity. In: Monographs in Developmental Biology, Vol. 14. S. Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sidney.
- Weber, R. (1967). Biochemistry of amphibian metamorphosis. In: The Biochemistry of Animal Development, Academic Press New York and London, II, 227-301.

VII. ABKÜRZUNGEN

AS : Antiserum
 AG : Antigen
 E = esc : Rana esculenta
 L = les : Rana lessonae
 R = rid : Rana ridibunda
 ExE_{D2} (Beispiel): Kreuzung Nr. 2 von Rana esculenta X Rana esculenta aus Biotop D.

Barbital-Na-Puffer: 3,96 g Barbital-Na
 770 ml H₂O bidest.

Holtfreetersche Lösung: 3,50 g NaCl
 0,05 g KCl
 0,10 g CaCl₂
 0,20 g NaHCO₃
 1000 ml H₂O bidest.

IEF : Isoelektrische Fokussierung
 LDH : Lactatdehydrogenase
 NAD : Nicotinamid-adenin-dinucleotid
 NBT : Nitroblautetrazolium
 PAGE : Polyacrylamid- Gel- Elektrophorese
 PBS : Phosphatpuffer (0,15 m, pH 7,4)
 PMS : Phenazinmethosulfat
 Tris : Tris (hydroxymethyl) aminomethan

γ ABA : γ Aminobuttersäure	GLY : Glycin
β AiBA: β Aminoisobuttersäure	HIS : Histidin
ALA : Alanin	ILE : Isoleucin
ARG : Arginin	LEU : Leucin
ASN : Asparagin	LYS : Lysin
ASP : Asparaginsäure	MET : Methionin
CYS : Cystin	ORN : Ornithin
GLN : Glutamin	PEA : Phosphaethanolamin

PHE : Phenylalanin

PRO : Prolin

PSER: Phosphoserin

SER : Serin

TAU : Taurin

THR : Threonin

TYR : Tyrosin

VAL : Valin

CURRICULUM VITAE

Am 10. März 1948 wurde ich, Jürg Alexander Binkert, Bürger von Leibstadt (AG), in Winterthur geboren. Ich besuchte in Schaffhausen 6 Jahre die Primarschule, 2 Jahre die Realschule, 2 Jahre die realistische Abteilung der Kantonsschule, um dann ins Lehrerseminar einzutreten, welches ich 1969 mit dem Kantonalen Lehrerpateht verliess. Nach zweijähriger Berufstätigkeit als Primarlehrer in Lenzerheide (GR) immatrikulierte ich mich im Herbst 1971 an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich. Im Frühjahr 1976 erwarb ich das Diplom als Naturwissenschaftler. Von 1976 bis 1981 arbeitete ich an meiner Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P. S. Chen. Seit 1974 bin ich als Assistent in Kursen für Entwicklungsbiologie der Amphibien tätig.

Bei folgenden Dozenten besuchte ich Vorlesungen und Uebungen: Bachofen, Baker, Batschelet, Biegert, Billeter, Birnstiel, Briegel, Burla, Chen, Christen, Cook, Egger, Endress, Greuter, Hansen, Hohl, Humbel, Jungen, Jungen-Hauschteck, Kägi, Knüsel, Kuhn-Schnyder, Kubik, Kubli, Kummer, Lutz, Melli, Nöthiger, Oswald, Pfluger, Rast, Rieber, Rohweder, Schächpi, Scheffrahn, Schlittler, Schmid, Staub, Schneider, Tardent, Thomas, Wanner, Watts, Weber, Wehner, Weissmann, Woodtli, Ziswiler, Zuber.

